

MESTRADO  
TOXICOLOGIA E CONTAMINAÇÃO AMBIENTAIS

# EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DE MICROPLÁSTICOS E OUTROS CONTAMINANTES AMBIENTAIS EM *DAPHNIA MAGNA*

Ana Cristina Borges Barbosa

**M**  
2017



Efeitos ecotoxicológicos de microplásticos e outros contaminantes ambientais em *Daphnia magna*  
Ana Cristina Borges Barbosa



Ana Cristina Borges Barbosa

**Efeitos ecotoxicológicos de microplásticos e outros  
contaminantes ambientais em *Daphnia magna***

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Toxicologia e Contaminação Ambientais submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar e à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Orientador – Professora Doutora Lúcia Maria das Candeias Guilhermino

Categoria – Professora Catedrática

Afiliações – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar e Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental da Universidade do Porto

O trabalho de investigação conducente à presente Dissertação de Mestrado foi desenvolvido no âmbito do projeto “PLASTICGLOBAL – *Avaliação da transferência de agentes químicos mediada por microplásticos e dos seus efeitos em redes tróficas de ecossistemas de mar profundo, costeiros e estuarinos em cenários de mudanças globais*” (FCT: PTDC/MAR-PRO/1851/2014; LISBOA-01-0145-FEDER-016885), financiado por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT/MCTES, PIDDAC) e cofinanciado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do COMPETE – Programa Operacional Fatores de Competitividade (POFC) e do Lisboa 2020 no âmbito do programa Portugal 2020.



UNIÃO EUROPEIA  
Fundo Europeu  
de Desenvolvimento Regional



UNIÃO EUROPEIA  
Fundos Europeus  
Estruturais e de  
Investimento

## AGRADECIMENTOS

À Professora Lúcia Guilhermino, pela disponibilidade e paciência.

À Doutora Alexandra Martins, por me ter ensinado a fazer as culturas dos organismos e os ensaios de toxicidade.

Aos meus pais e à minha família, pelo apoio.

À minha irmã, por ser o brilho dos meus olhos.

A Tânia, à Lídia e à Sónia pela Amizade.

Ao Paul, por tudo! Pelo carinho, ajuda e apoio incansáveis.

## RESUMO

Os microplásticos são polímeros sintéticos de dimensões inferiores a 5 mm ubiquamente encontrados no meio aquático. Em comparação com os organismos marinhos, existem poucos estudos acerca dos efeitos destas partículas em espécies de água doce, principalmente em mistura com outros contaminantes ambientais. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo central investigar os efeitos de microesferas plásticas (1 – 5 µm de diâmetro), doravante designadas por microplásticos, isoladamente e em misturas, com o pesticida dimetoato no microcrustáceo de água doce *Daphnia magna*. Para o efeito, foram testadas as seguintes hipóteses nulas: (i) os microplásticos em concentrações até 1,25 mg/l, não induzem efeitos letais em juvenis de *D. magna* após exposição aguda (96 h) através do meio de teste; (ii) concentrações de 0,05 mg/l e de 0,1 mg/l de microplásticos não induzem toxicidade crónica em *D. magna* e (iii) a presença de microplásticos no meio não influencia a toxicidade crónica do dimetoato para *D. magna*.

Foram realizados dois bioensaios: um para avaliação dos efeitos agudos dos microplásticos em *D. magna*, tendo tido uma duração de 96 h, e outro de 21 dias para avaliação da toxicidade crónica dos microplásticos em *D. magna*, isoladamente e em misturas com o dimetoato. Nas concentrações testadas (0,05 – 1,25 mg/l), os microplásticos não causaram efeitos letais em juvenis *D. magna*, durante as 96 h de exposição, o que levou à aceitação da primeira hipótese nula. No bioensaio crónico, os tratamentos contendo os microplásticos isoladamente (0,05 mg/l e 0,1 mg/l) não causaram efeitos significativos no crescimento somático, na idade de libertação da primeira ninhada, no número total de juvenis e no número de juvenis móveis; contudo, a concentração de microplásticos mais baixa testada (0,05 mg/l) induziu a libertação de ovos abortados, com efeitos significativos em relação ao controlo, indicando efeitos adversos na reprodução, o que levou à rejeição da segunda hipótese nula. Ainda no bioensaio crónico, os tratamentos que continham apenas dimetoato (0,125 mg/l e 2,5 mg/l) não induziram efeitos significativos em nenhum dos parâmetros biológicos analisados. Nas concentrações de microplásticos e dimetoato testadas, as misturas das duas substâncias também não causaram efeitos significativos relativamente aos observados nos tratamentos contendo apenas dimetoato, o que levou à aceitação da terceira hipótese nula. Em suma, os resultados do presente estudo indicam que os microplásticos podem causar efeitos adversos na reprodução de *D. magna* e que os efeitos não aumentam diretamente com o aumento da concentração de exposição.

Palavras-chave: *Daphnia magna*, microplásticos, dimetoato, misturas, mortalidade, crescimento, reprodução.

## ABSTRACT

Microplastics are synthetic polymers with less than 5 mm ubiquitously found in the aquatic environment. In relation to the marine organisms, there are less studies on the effects of microplastics on freshwater species, especially when in mixtures with other environmental contaminants. Thus, the main objective of this study was to investigate the effects of plastic microspheres (1 – 5  $\mu\text{m}$  diameter), hereafter indicated as microplastics alone and in mixtures, with the pesticide dimethoate on the freshwater microcrustacean *Daphnia magna*. The following null hypotheses were tested: (i) short-term exposure (96 h) to microspheres at concentrations up to 1,25 mg/l, through the test medium does not lethal effects on *D. magna* juveniles; (ii) concentrations of 0.05 mg/l and 0.1 mg/l of microplastics do not induce chronic effects on *D. magna*, and (iii) the presence of microplastics in the test medium does not influence the chronic toxicity of dimethoate to *D. magna*.

Two bioassays were performed: one to evaluate the lethal effects of microplastics on *D. magna* juveniles over, 96 h, and another one of 21 days to evaluate the chronic toxicity of microplastics in *D. magna*, alone and in combination with dimethoate. In the concentrations tested (0.05 - 1.25 mg/l), the microplastics did not cause lethal effects on *D. magna* juveniles during the 96 h of exposure, which led to the acceptance of the first null hypothesis. In the chronic bioassay, the treatments containing only the microplastics (0.05 mg/l and 0.1 mg/l) did not cause significant effects on the growth, the age of first brood release, the total number of juveniles produced and the number of mobile juveniles produced; however, the lowest concentration of microplastics tested (0.05 mg/l) induced the release of aborted eggs, thus indicating adverse effects on reproduction, which led to the rejection of the second null hypothesis. In relation to the treatments containing dimethoate only the concentrations tested (0.125 mg/l and 0.25 mg/l) did not induce significant effects in any of the biological parameters analyzed. The mixtures of the two substances did not cause effects significantly different of those induced by treatments containing dimethoate alone, which led to the acceptance of the third null hypothesis. In summary, the results of the present study indicate that microplastics may adverse effects on *D. magna* reproduction and that the effects may not increase at increasing concentrations of microplastics.

Key words: *Daphnia magna*, microplastics, dimethoate, mixtures, mortality, growth, reproduction.

# ÍNDICE

Agradecimentos.....	iii
Resumo .....	iv
Abstract .....	vi
Índice de Figuras.....	x
Índice de Tabelas.....	xii
Lista de Abreviaturas.....	ixiv
1. Introdução.....	11
1.1. Plásticos e microplásticos .....	11
1.2. Dimetoato.....	19
1.3. Objetivos da Dissertação.....	21
2. Material e Métodos .....	23
2.1. Substâncias químicas.....	23
2.2. Cultura de <i>C. vulgaris</i> e preparação do alimento para <i>D.magna</i> .....	23
2.3. Culturas parentais de <i>D.magna</i> .....	24
2.4. Metodologia para determinação das concentrações de dicromato de potássio e microplásticos no meio de teste .....	25
2.5. Bioensaios agudos .....	27
2.5.1. Bioensaio agudo para avaliação da toxicidade de dicromato de potássio .....	28
2.5.2. Bioensaio agudo para avaliação da toxicidade do dimetoato .....	28
2.5.3. Bioensaio agudo para avaliação da toxicidade de microplásticos .....	29
2.6. Bioensaio crónico para avaliação da toxicidade de microplásticos e de dimetoato, isoladamente e em misturas.....	30
2.7. Análise estatística .....	31
3. Resultados.....	34
3.1. Padronização dos métodos analíticos para determinação das concentrações reais de dicromato de potássio e microplásticos no meio de teste durante os bioensaios.....	34
3.2. Condições gerais dos bioensaios .....	38



3.3. Toxicidade aguda de dicromato de potássio para juvenis de <i>D. magna</i> .....	38
3.4. Toxicidade aguda de dimetoato para juvenis <i>D. magna</i> .....	40
3.5. Efeitos agudos de microplásticos em juvenis de <i>D. magna</i> .....	41
3.6. Efeitos crônicos de microplásticos e dimetoato, isoladamente e em misturas, em <i>D. magna</i> .....	44
4. Discussão .....	48
4.1 Padronização dos métodos analíticos para determinação das concentrações reais de dicromato de potássio e microplásticos no meio de teste dos bioensaios.....	48
4.2. Validação dos bioensaios .....	49
4.3. Toxicidade aguda do dicromato de potássio para juvenis de <i>D. magna</i> .....	49
4.4. Toxicidade aguda do dimetoato para juvenis de <i>D. magna</i> .....	50
4.5. Efeitos agudos de microplásticos em juvenis de <i>D. magna</i> .....	50
4.6. Efeitos crônicos de microplásticos e dimetoato, isoladamente e em misturas, em <i>D. magna</i> .....	52
5. Conclusões .....	57
Lista de referências bibliográficas .....	59
Apêndice A – Número de partículas por litro nas concentrações de microplásticos testadas nos bioensaios agudo e crônico .....	72
Apêndice B – Parâmetros físico-químicos medidos durante os bioensaios .....	73
Anexo I – Composição química do meio de cultura de <i>C. vulgaris</i> .....	79
Anexo II – Preparação e composição química do meio ASTM usado nas culturas parentais de <i>D. magna</i> .....	80
Anexo III – Preparação da solução de vitaminas usada nos meios de cultura e do extrato de <i>A. nodosum</i> usado para enriquecer o meio ASTM.....	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efeitos biológicos dos microplásticos e interações entre si.....	18
Figura 2. Espectros de absorção UV-visível das seguintes soluções: A – solução com uma concentração de 7,1 mg/l de Cr(VI) preparada em meio ASTM sem vitaminas; B – solução com uma concentração de 7,1 mg/l de Cr(VI) preparada em água ultrapura com pH básico e C – meio ASTM sem vitaminas (pH $\approx$ 8,48) e sem Cr(VI). D.O. – unidades de densidade ótica.....	35
Figura 3. Modelo de regressão linear ajustado aos dados da concentração de Cr(VI) e da absorvância em meio ASTM sem vitaminas (A) e em água ultrapura com pH básico (B). o – concentrações das soluções de Cr(VI). D.O. – densidade ótica. $R^2$ – coeficiente de determinação.....	37
Figura 4. Modelo de regressão linear ajustado aos dados da concentração de microplásticos e da fluorescência em meio ASTM sem vitaminas (A) e em água ultrapura (B). o – concentrações das soluções de microplásticos. F.R.- fluorescência relativa. $R^2$ - coeficiente de determinação.....	38
Figura 5. Percentagens de imobilização cumulativa de <i>Daphnia magna</i> obtidas às 24 e 48 h nos tratamentos do bioensaio agudo com o dicromato de potássio CTR – controle.....	40
Figura 6. Percentagens de imobilização cumulativa de <i>Daphnia magna</i> obtidas às 48, 72 e 96 h nos tratamentos do bioensaio agudo com o dimetoato. CTR – controle.....	41
Figura 7. Indivíduos de <i>Daphnia magna</i> após 96 h de exposição a 1,25 mg/l (A) e 0,95 mg/l (B) de microplásticos.....	42
Figura 8. Percentagens de imobilização cumulativa de <i>Daphnia magna</i> obtidas às 48, 72 e 96 h nos tratamentos do bioensaio agudo com os microplásticos. CTR – controle.....	42
Figura 9. Efeitos crônicos de microplásticos e de dimetoato, isoladamente e em misturas, em <i>Daphnia magna</i> . A – média do crescimento somático; B – média da idade de libertação da primeira ninhada; C – média do número total de juvenis produzidos por fêmea; C – média do número de juvenis móveis produzidos por fêmea e D – média do número de ovos abortados produzidos por fêmea. Os resultados são a média das progenitoras que sobreviveram até ao fim dos 21 dias de exposição com as	

correspondentes barras de erro padrão da média. Para cada tratamento,  $n = 5$ , à exceção do tratamento 0,1MP+0,25D, cujo  $n = 4$ . CTR – controlo. 0,05MP - 0,05 mg/l de microplásticos. 0,1MP - 0,1 mg/l de microplásticos. 0,125D - 0,125 mg/l de dimetoato. 0,25D - 0,25 mg/l de dimetoato. 0,05MP+0,125D - 0,05 mg/l de microplásticos e 0,125 mg/l de dimetoato. 0,05MP+0,25D - 0,05 mg/l de microplásticos e 0,25 mg/l de dimetoato. 0,1MP+0,125D - 0,1 mg/l de microplásticos e 0,125 mg/l de dimetoato. 0,1MP+0,25D - 0,1 mg/l de microplásticos e 0,25 mg/l de dimetoato. Letras diferentes em cima das barras significam diferenças estatísticas significativas (teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn;  $p \leq 0,05$ ).....46

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Os principais tipos de plásticos produzidos mundialmente e a sua respetiva abreviatura, estrutura química, densidade e principais aplicações. Compilação efetuada a partir das seguintes fontes: Andrady, 2011; Hidalgo-Ruz *et al.*, 2012; PlasticsEurope, 2015; Wang *et al.*, 2016.....13

Tabela 2. Propriedades físico-químicas do dimetoato. Compilação baseada em Scoy *et al.*, 2016 e WHO, 2004.....21

Tabela 3. Concentrações nominais e reais de dicromato de potássio e de Cr(VI) nas soluções de teste e o decaimento do Cr(VI) no meio de teste do bioensaio agudo com o dicromato de potássio e *Daphnia magna*. As concentrações reais de Cr(VI) foram calculadas a partir das leituras individuais da absorvância, usando o modelo de regressão linear: concentração de Cr(VI) (mg/l) = 0,079 + 11,164 x absorvância (unidades de densidade ótica). As concentrações reais de dicromato de potássio foram calculadas a partir das concentrações reais de Cr(VI). O desvio médio (das concentrações reais de dicromato de potássio em relação às nominais) =  $| 100 - (\text{concentração real} \times 100 / \text{concentração nominal}) |$ , expresso em percentagem. O decaimento (decaimento do Cr(VI) no meio de teste durante o período de exposição) =  $(\text{média da absorvância às 0 h} - \text{média da absorvância às 48 h}) \times 100 / \text{média da absorvância às 0 h}$ , expresso em percentagem. Os resultados são a média  $\pm$  desvio padrão (n = 4). Conc. – concentração. Abs. – absorvância. D.O. – densidade ótica. 0 h – início do bioensaio. 48 h – fim do bioensaio.....39

Tabela 4. Percentagens de imobilização não cumulativa de *Daphnia magna* obtidas às 24, 48, 72 e 96 h nos tratamentos do bioensaio agudo com os microplásticos. Os dados são a média  $\pm$  erro padrão da média (n = 4). E.P.M – erro padrão da média. CTR – controlo.....43

Tabela 5. Resultados do teste de Kruskal-Wallis para comparar entre diferentes períodos de exposição (24, 48, 72 e 96 h) a percentagem de imobilização não cumulativa obtida em cada tratamento do bioensaio agudo com os microplásticos e *Daphnia magna*. Para cada tratamento, n = 4. O nível de significância foi de 0,05. CTR = controlo.....43

Tabela 6. Resultados da análise de variância com dois fatores (2-ANOVA) para investigar os efeitos de microplásticos e de dimetoato e potencial interação entre os dois fatores, após 21 dias de exposição, no crescimento somático (N = 36), número total de juvenis (N

= 44) e número de juvenis móveis (N = 44) de <i>Daphnia magna</i> . n – número de fêmeas progenitoras. D.P. – desvio padrão. MP – microplásticos. D – dimetoato. MP x D – interação. MP – microplásticos. D – dimetoato. 0,05 – 0,05 mg/l. 0,1 – 0,1 mg/l. 0,125 – 0,125 mg/l. 0,25 – 0,25 mg/l.....	47
Tabela A.1. Número de partículas de plástico presente nas concentrações de microplásticos testadas no ensaio agudo com <i>Daphnia magna</i> .....	73
Tabela A.2. Número de partículas de plástico presente nas concentrações de microplásticos testadas no ensaio crónico com <i>Daphnia magna</i> .....	73
Tabela B.1. Parâmetros físico-químicos medidos ao longo das 48 h do ensaio agudo com o dicromato de potássio e <i>Daphnia magna</i> . Os dados são a média ± desvio padrão (n = 4).....	74
Tabela B.2. Parâmetros físico-químicos medidos ao longo das 96 h do ensaio agudo com o dimetoato e <i>Daphnia magna</i> . Os dados são a média ± desvio-padrão (n = 4).....	75
Tabela B.3. Parâmetros físico-químicos medidos a diferentes períodos de exposição no meio novo do ensaio agudo com os microplásticos e <i>Daphnia magna</i> . Os dados são a média ± desvio-padrão (n = 4).....	76
Tabela B.4. Parâmetros físico-químicos medidos a diferentes períodos de exposição no meio velho do ensaio agudo com os microplásticos e <i>Daphnia magna</i> . Os dados são a média ± desvio-padrão (n = 4).....	77
Tabela B.5. Parâmetros físico-químicos medidos na primeira, segunda e terceira semana, no meio novo e velho, do ensaio crónico para testar os efeitos dos microplásticos e do dimetoato no crescimento somático e reprodução de <i>Daphnia magna</i> . Os dados são a média ± desvio-padrão. (n = 6 ou 7).....	78
Tabela I.1. Composição química do meio MBL usado nas culturas de <i>Chorella vulgaris</i> (adaptado de Guilhermino, 1996).....	80
Tabela II.1. Composição química do meio ASTM utilizado nas culturas parentais de <i>Daphnia magna</i> (adaptado de Guilhermino, 1996).....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS

2-ANOVA – Análise de Variância com dois fatores

ANOVA – Análise de Variância

AChE – Acetilcolinesterase

ASTM – *American Society for Testing and Materials*

CE<sub>50</sub> – Concentração Efetiva Mediana

CL<sub>50</sub> – Concentração Letal Mediana

CENO – Concentração de Efeito Não Observado

CEO – Concentração de Efeito Observado

CIIMAR – Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental da Universidade do Porto

Cr(VI) – Crómio

CrO<sub>4</sub><sup>-</sup> – Ião cromato

D.O. – Densidade Ótica

F.R. – Fluorescência Relativa

ICBAS – Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto

OCDE – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico

R<sup>2</sup> – Fluorescência Relativa

r<sub>s</sub> – Coeficiente de correlação de Spearman

u.p. – ultrapura

UV-Vis – UV-Visível

# 1. INTRODUÇÃO

Com o crescimento da população humana, a necessidade de alimentos, água de qualidade, cuidados médicos, terrenos para agricultura, áreas para habitação e diversas atividades, energia e bens é cada vez maior (Dunlap e Jorgenson, 2012; de Sherbinin *et al.*, 2007). Como consequência, a contaminação do ambiente por pesticidas, fármacos e outros compostos químicos, vários tipos de polímeros e nanomateriais, usados nas diversas atividades antrópicas é um problema crescente que está a colocar em risco a vida selvagem, a integridade dos ecossistemas e o nosso bem-estar (Dunlap e Jorgenson, 2012; Sauvé e Desrosiers, 2014). Deste modo, para que possamos adotar estratégias de consciencialização, prevenção, mitigação e remediação mais eficazes, torna-se importante continuar a estudar os efeitos destes contaminantes nos sistemas bióticos e abióticos.

## 1.1. Plásticos e microplásticos

Desde os anos 50 do século XX até à atualidade, a produção global de plásticos aumentou de cerca de 1,7 para cerca de 311 milhões de toneladas por ano (PlasticsEurope, 2013, 2015). Os plásticos são polímeros sintéticos e são tipicamente produzidos a partir da polimerização de monómeros derivados do petróleo, carvão ou gás natural (Cole *et al.*, 2011; PlasticsEurope, 2015). Atualmente existem centenas de tipos de plásticos diferentes (Andrady e Neal, 2009), sendo que 90% da produção global corresponde ao polietileno, polipropileno, poliestireno, policloreto de vinil e tereftalato de polietileno (Phuong *et al.*, 2016) (Tabela 1). Devido a características como versatilidade, leveza, durabilidade, impermeabilidade, bom isolamento térmico e elétrico e baixo custo de produção, os plásticos estão presentes numa grande quantidade de produtos de utilização diária, incluindo produtos domésticos diversos, computadores e equipamentos eletrónicos, materiais médico-cirúrgicos, produtos diversos utilizados na construção e outras indústrias, entre muitos outros materiais (Andrady e Neal, 2009; PlasticsEurope, 2015). Os benefícios sociais do uso de plásticos são vastos, permitindo melhorias na saúde das pessoas e animais, poupanças de energia, diversos tipos de avanços tecnológicos e acesso a muitos tipos de produtos a baixo custo (Andrady e Neal, 2009). Contudo, o uso cada vez maior deste material, principalmente em itens descartáveis, os quais correspondem a cerca de 50% da produção global de plástico, aliado à sua durabilidade intrínseca e baixas taxas de recuperação, está a acarretar um dos maiores

problemas ambientais conhecidos da atualidade, nomeadamente a entrada e acumulação de plásticos no ambiente (Avio *et al.*, 2016; Barnes *et al.*, 2009; Hopewell *et al.*, 2009). Um dos tipos de ambientes mais afetados por este problema é o meio aquático (Wright *et al.*, 2013a). Introduzidos diretamente de forma deliberada e/ou acidental e/ou transportados pelo vento, efluentes contaminados, lixiviação dos solos, entre outros processos, detritos plásticos designados por macroplásticos têm vindo a acumular-se nos ecossistemas aquáticos onde representam uma ameaça para vida selvagem (Barnes *et al.*, 2009; Derraik, 2002; Wright *et al.*, 2013a). Uma vez no meio aquático, os macroplásticos podem persistir durante dezenas a centenas de anos, sofrendo ao longo do tempo alterações das suas propriedades e fragmentação sucessiva (Andrady, 2011; Barnes *et al.*, 2009;). Por exemplo, no meio aquático, os macroplásticos absorvem a radiação ultravioleta (UV) da luz solar e sofrem reações fotolíticas, foto-oxidativas e termo-oxidativas que resultam na quebra de ligações químicas e na subsequente formação de novos grupos funcionais (Andrady, 2011; Shah *et al.*, 2008). Como consequência, a massa molar média do polímero é reduzida e as suas propriedades mecânicas são alteradas, levando à formação de fraturas e superfícies irregulares, descoloração do material, entre outras alterações (Andrady, 2011; Shah *et al.*, 2008). Estes plásticos degradados sob condições ambientais de elevada humidade, diferenças de temperatura e abrasão (por exemplo, por ação de hidrodinamismo e colisão com outros materiais ou estruturas físicas) são fragmentados em partículas de dimensões menores (Andrady, 2011). As partículas com dimensões inferiores a 5 mm são comumente designadas por microplásticos (Arthur *et al.*, 2009).

Os microplásticos podem ter origem na fragmentação de macroplásticos (como mencionado anteriormente) ou podem entrar diretamente no meio aquático já na forma de partículas de tamanho inferior a 5 mm (Ivar do Sul e Costa, 2014; Phuong *et al.*, 2016). Os primeiros são designados por microplásticos secundários e os últimos por microplásticos primários. Exemplos de microplásticos primários são os “pellets” de pré-produção de produtos plásticos e as microesferas presentes em produtos exfoliantes e outros produtos de uso pessoal (Ivar do Sul e Costa, 2014; Phuong *et al.*, 2016). Independentemente da sua origem, os microplásticos, devido ao seu pequeno tamanho, representam um perigo para a vida selvagem (Avio *et al.*, 2016; Depledge *et al.*, 2013).



**Tabela 1.** Os principais tipos de plásticos produzidos mundialmente e a sua respetiva abreviatura, estrutura química, densidade e principais aplicações. Compilação efetuada a partir das seguintes fontes: Andrady, (2011), Hidalgo-Ruz *et al.*, (2012), PlasticsEurope (2015), Wang *et al.*, (2016).

Polímero	Abreviatura	Estrutura química	Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	Principais aplicações
Polietileno	PE	$\left[ \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \right]_n$	0,91 - 0,96	Sacos de plástico, película plástica, embalagens e redes
Polipropileno	PP	$\left[ \text{CH}_2 - \underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} \right]_n$	0,85 - 0,91	Cordas, tampas de garrafas, redes e amortecedores de automóveis
Poliestireno	PS	$\left[ \text{CH}_2 - \underset{\text{C}_6\text{H}_5}{\text{CH}} \right]_n$	1,04 - 1,10	Utensílios de cozinha descartáveis e contentores de acondicionamento de alimentos
Policloreto de vinil	PVC	$\left[ \text{CH}_2 - \underset{\text{Cl}}{\text{CH}} \right]_n$	1,16 - 1,58	Película plástica, embalagens e materiais médico-cirúrgicos
Polietileno tereftalato	PET	$\left[ \text{O} - \text{C}(=\text{O}) - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{C}(=\text{O}) - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \right]_n$	1,37 - 1,45	Garrafas de água e de sumos

Os microplásticos são considerados contaminantes ubíquos no meio aquático (Phuong *et al.*, 2016; Wright *et al.*, 2013a). No meio marinho têm sido encontrados a diferentes latitudes desde os polos ao equador, em áreas costeiras e em oceano aberto, com concentrações variáveis (Phuong *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). Por exemplo, na costa portuguesa foram encontradas concentrações médias entre 0,002 e 0,036 partículas/m<sup>3</sup> de água (Frias *et al.*, 2014), ao passo que em áreas mais contaminadas de outras regiões as concentrações atingem valores mais altos, por exemplo 9180 partículas/m<sup>3</sup> de água (Desforges *et al.*, 2014). Nos sistemas de água doce, os microplásticos têm sido encontrados em sistemas lênticos e lóticos em quase todos os continentes e também em concentrações variáveis (Eerkes-Medrano *et al.*, 2015; Biginagwa *et al.*, 2016). Mencione-se a título exemplificativo, concentrações médias de 20264 partículas/km<sup>2</sup> no Lago Hovsgol na Mongólia (Free *et al.*, 2014) e 220000 partículas/km<sup>2</sup> no Lago Maggiore na Suíça (Faure *et al.*, 2015). No Rio Los Angeles, nos Estados Unidos da América (EUA), foi reportada uma concentração máxima de 12652 itens/m<sup>3</sup> (Moore *et al.*, 2011). Relativamente a Portugal, ainda não existem estudos acerca da ocorrência de microplásticos em águas continentais. Tanto no meio marinho

como no meio dulçaquícola, os microplásticos têm sido detetados principalmente sob a forma de fibras e fragmentos. No entanto, nos sistemas de água doce, devido à proximidade de muitos centros urbanos e instalações industriais, são também predominantemente encontrados sob a forma de microesferas e “pellets” (Eerkes-Medrano *et al.*, 2015; Phuong *et al.*, 2016; Wright *et al.*, 2013a;). Os três principais tipos de plásticos encontrados no meio aquático correspondem ao polietileno, polipropileno e poliestireno (Hidalgo-Ruz *et al.*, 2012; Phuong *et al.*, 2016).

Como resultado do seu reduzido tamanho, os microplásticos podem ser ingeridos por um grande número de organismos aquáticos. Experiências em laboratório têm demonstrado que são ingeridos por cnidários (e.g. Cole *et al.*, 2013), cladóceros (e.g. Setälä *et al.*, 2014), rotíferos (e.g. Jeong *et al.*, 2016), copépodes (e.g. Cole *et al.*, 2013), anfípodes (e.g. Chua *et al.*, 2014), isópodes (Haemer *et al.*, 2014), equinodermes (Wright *et al.*, 2013a), anelídeos (e.g. Wright *et al.*, 2013b), bivalves (e.g. Browne *et al.*, 2008), gastrópodes (Imhof e Laforsch, 2016), caranguejos (e.g. Brenncke *et al.*, 2015) e peixes (e.g. de Sá *et al.*, 2015), entre outros. Os resultados dos ensaios laboratoriais têm sido corroborados por estudos de campo. Estes têm mostrado que mais de 50 espécies marinhas incluindo zooplâncton (Desforges *et al.*, 2015), anelídeos (Van Cauwenberghe *et al.*, 2015), bivalves (e.g. de Witte *et al.*, 2014; Santana *et al.*, 2016;), camarões (Devriese *et al.*, 2015), peixes (e.g. Lusher *et al.*, 2015; Neves *et al.*, 2015) e mamíferos (Besseling *et al.*, 2015) ingerem microplásticos no seu habitat natural. Por exemplo, espécimes do copépode *Neocalanus cristatus* e do eufausídeo *Euphausia pacifica* recolhidos no Nordeste do Oceano Pacífico, continham em média 0,03 e 0,06 itens por indivíduo, respetivamente (Desforges *et al.*, 2015). Em espécies de água doce existem ainda poucos estudos de campo e estes são, por sua vez, limitados a espécies de peixes. Por exemplo, foi reportado que 45% e 44% dos indivíduos de *Lepomis macrochirus* e *Lepomis megalotis*, respetivamente, recolhidos na bacia hidrográfica do Rio Brazos nos EUA continham microplásticos no seu estômago (Peters e Bratton, 2016). Os microplásticos também podem entrar nos organismos aquáticos através das brânquias (von Moos *et al.*, 2012; Watts *et al.*, 2014). Por exemplo, mexilhões (*Mytilus edulis*) exibiram micropartículas no tecido branquial (via endocitose) após serem expostos durante 96 h a concentrações de aproximadamente  $2,7$  a  $3,7 \times 10^7$  microesferas de polietileno (1 - 80  $\mu\text{m}$  de diâmetro) por litro (von Moos *et al.*, 2012). Uma vez ingeridos, os microplásticos podem ficar retidos no trato gastrointestinal, serem absorvidos e transportados para outros tecidos/órgãos ou excretados através das fezes (Wright *et al.*, 2013a; Wang *et al.*, 2016). Por exemplo, na espécie *M. edulis* foi reportada a translocação de microesferas de poliestireno (3 e 9,6  $\mu\text{m}$  de diâmetro) da cavidade

intestinal para o sistema circulatório (hemolinfa e hemócitos) (Browne *et al.*, 2008) e a presença de micropartículas de polietileno (1 - 80 µm de diâmetro) em vacúolos digestivos do hepatopâncreas (digestão intracelular via endocitose) (von Moos *et al.*, 2012). No cladóceros de água doce *Daphnia magna*, após exposição de 30 min a 2 µg/l de microesferas de poliestireno (1 µm de diâmetro), juvenis e adultos apresentaram partículas no trato gastrointestinal e em gotículas de armazenamento de lípidos (Rosenkantz *et al.*, 2009). O período de permanência dos microplásticos nos organismos pode variar desde horas a semanas, dependendo da espécie e se ocorreu ou não transferência dos microplásticos do trato gastrointestinal para outros tecidos/orgãos (Browne *et al.*, 2008; Chua *et al.*, 2014; Setälä *et al.*, 2014). Quanto maior o período de permanência no organismo, maior a probabilidade dos microplásticos causarem efeitos adversos (Besseling *et al.*, 2012; Kaposi *et al.*, 2013). Os microplásticos também podem ser transferidos de um nível trófico inferior para o nível trófico seguinte. Por exemplo, em organismos marinhos, microesferas de poliestireno (10 µm de diâmetro) foram transferidas do mesozooplâncton para o camarão *Mysis relicta* (Setälä *et al.*, 2014) e de mexilhões para o caranguejo (*C. maenas*) (Watts *et al.*, 2014). Micropartículas de polietileno (1 - 20 µm de diâmetro) também foram transferidas de náuplios de *Artemia spp.* para o peixe de água-doce *Danio rerio* (Batel *et al.*, 2016). De realçar que, nos estudos de campo não se sabe se os microplásticos foram ingeridos diretamente ou através de transferência trófica.

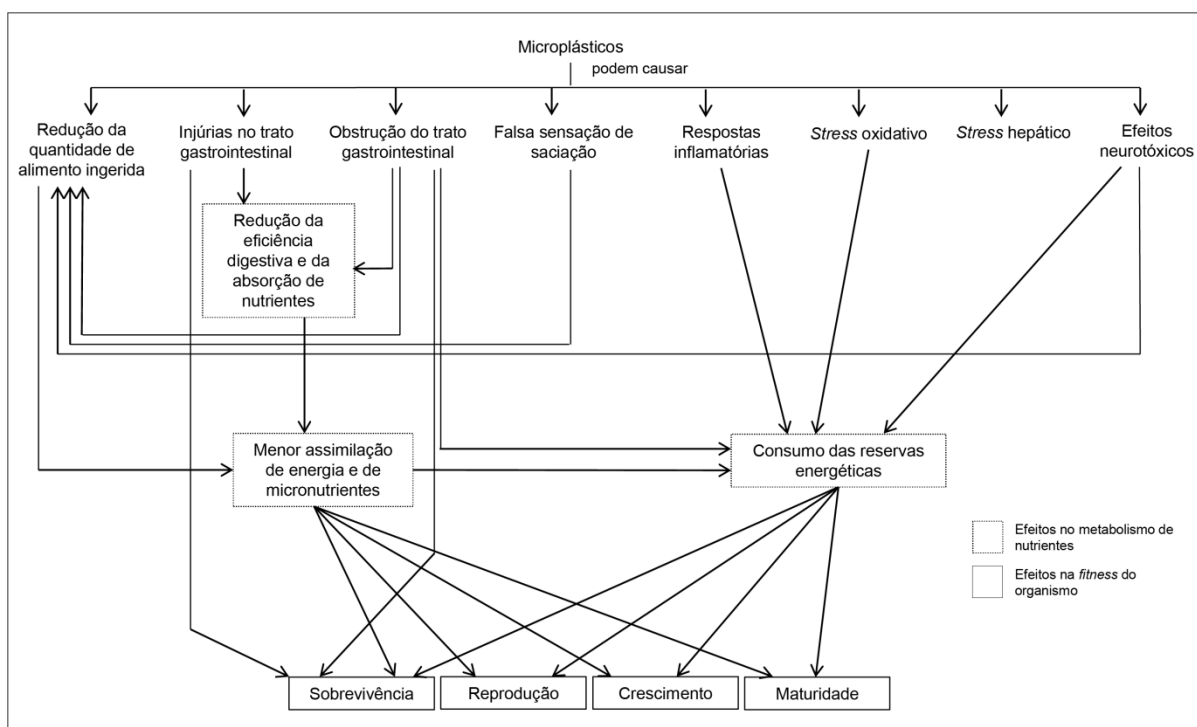
Após serem ingeridos ou incorporados de outras formas, os microplásticos podem causar diversos efeitos adversos. Em organismos marinhos, onde foi já efetuada uma quantidade considerável de estudos, foram encontrados efeitos significativos em espécies do zooplâncton (*e.g.* *Centropages typicus* e *Triglopus japonicus*), em algumas espécies benthônicas, nomeadamente em bivalves (*e.g.* *M. edulis*, *Perna viridis*, *M. galloprovincialis* e *Crassostrea gigas*) e poliquetas (*e.g.* *Arenicola marina*) e em espécies de peixes (*e.g.* *Pomatochistus microps*, *Dicentrarchus labrax*). Em *C. typicus*, exposição a suspensões de microesferas de poliestireno em concentrações superiores a 4000 itens/ml (7,3 µm de diâmetro) diminuiu as taxas de ingestão de alga (Cole *et al.*, 2013). Em *T. japonicus*, exposição a suspensões de microesferas de poliestireno entre 84 a 84 000 itens/ml (6 µm de diâmetro) provocou um decréscimo na fecundidade (número de náuplios da primeira ninhada) (Lee *et al.*, 2013). Em mexilhões (*M. edulis*), a presença de micropartículas de polietileno em vacúolos digestivos do hepatopâncreas provocou uma resposta inflamatória (encapsulamento por granulócitos) e uma redução significativa da estabilidade da membrana lisossomal (indicativo de stresse intracelular) (von Moos *et al.*, 2012). Em mexilhões *P. viridis* foi observado uma redução significativa das taxas de filtração, respiração e de produção de biscoito ao fim de 40 a 44 dias de exposição a

suspensões de micropartículas de policloreto de vinil ( $1,2 \times 10^8$  e  $1,2 \times 10^9$  partículas/ml; 1 – 50 de diâmetro) (Rist *et al.*, 2016). Um decréscimo significativo da atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi observado nas brânquias de espécimes de *M. galloprovincialis* após serem expostos durante 7 dias a 1,5 g/l de microplásticos de polietileno e poliestireno (< 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro) (Avio *et al.*, 2015). Na espécie *C. gigas*, efeitos tóxicos foram observados ao nível da reprodução. As ostras foram expostas durante a gametogénese a suspensões de microesferas de poliestireno (2170 partículas/ml; 2 e 6  $\mu\text{m}$  de diâmetro). Ao fim de dois meses, foram observados efeitos negativos no número e diâmetro dos oócitos e na velocidade dos espermatozoides que, por sua vez, impactaram negativa e significativamente a performance da descendência (menor rendimento larvar e crescimento das larvas mais lento). Adicionalmente, nas ostras expostas a microplásticos foram observados hemócitos significativamente maiores e com maior atividade oxidativa, indicando um distúrbio na homeostase (Sussarellu *et al.*, 2015). Em poliquetas (*A. marina*) foi observado, após 28 dias de exposição a sedimentos contaminados com 5% de grânulos de policloreto de vinil não plastificado (130  $\mu\text{m}$  de diâmetro), uma redução da atividade de alimentação um aumento da atividade fagocítica do fluido celómico e uma redução das reservas energéticas totais (cerca de 50%). Os autores propuseram que a depleção das reservas energéticas foi o resultado combinado da inflamação, diminuição da atividade de alimentação e longos períodos de residência dos microplásticos no trato gastrointestinal (Wright *et al.*, 2013b). Em juvenis do góbio comum (*P. microps*) expostos a suspensões de microesferas de polietileno durante 96 h (18,4  $\mu\text{g/l}$ , 184  $\mu\text{g/l}$  e 216  $\mu\text{g/l}$ ; 1 - 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro), foi observado um decréscimo significativo da atividade da AChE em relação ao controlo (Luís *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2013). Já no robalo (*D. labrax*), larvas expostas durante 36 dias a microesferas de polietileno ( $1 \times 10^5$  itens/g de alimento; 10 - 45  $\mu\text{m}$  de diâmetro) exibiram taxas de mortalidade significativamente maiores que o controlo (Mazurais *et al.*, 2015) e adultos apresentaram alterações patológicas significativas, de nível moderado a severo, no epitélio intestinal após exposição a fragmentos de policloreto de vinil ao longo de 90 dias (1 g itens/kg alimento; < 300  $\mu\text{m}$  de tamanho) (Pedà *et al.*, 2016). Estas alterações, nomeadamente estruturais, morfológicas e inflamatórias, poderão reduzir ou comprometer totalmente as funções intestinais (Pedà *et al.*, 2016).

Em espécies de água doce existem menos estudos acerca dos efeitos do microplásticos do que em organismos marinhos (Lambert e Wagner, 2016). Dos estudos realizados, foram encontrados efeitos em *D. magna* e nas espécies de peixes *Clarias gariepinus*, *Oryzias latipes* e *Perca fluviatilis*. Em *D. magna*, a ingestão de microesferas de polietileno (1 – 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro) durante exposição a 96 h a concentrações entre 12,5 e

400 mg/l provocou a imobilização dos animais, tendo sido calculada uma concentração efetiva mediana ( $CE_{50}$ ) de 57,43 mg/l (Rehse *et al.*, 2016). Ainda na mesma espécie, exposição durante 72 h a  $2,25 \times 10^5$  /ml de microesferas plásticas (2  $\mu$ m de diâmetro) provocou uma redução das taxas de alimentação de alga e, paralelamente, exposição a fragmentos de polietileno de 2,6  $\mu$ m de tamanho ( $1 \times 10^5$  partículas/ml), durante 21 dias, causou a morte das progenitoras, um aumento do período entre ninhadas e diminuiu o número de descendentes (Ogonowski *et al.*, 2016). Em juvenis de *C. gariepinus* expostos durante 96 h, com alimento, a fragmentos de polietileno de <60  $\mu$ m de tamanho (14 000 partículas/l) foram observadas alterações patológicas significativas no tecido hepático e uma diminuição significativa das reservas de glicogénio neste tecido (Karami *et al.*, 2016). Um decréscimo das reservas de glicogénio no fígado foi igualmente observado em adultos de *O. latipes* expostos, com alimento, durante 2 meses a 8 ng/ml de microplásticos (“pellets”) de polietileno (< 500  $\mu$ m de diâmetro) (Rochman *et al.*, 2013). Um estudo com larvas de perca Europeia (*P. fluviatilis*) revelou que os microplásticos, em concentrações ambientalmente relevantes, podem influenciar negativamente o desenvolvimento dos organismos e a sua ecologia. Neste estudo, exposição a 80 itens/l de micropartículas de poliestireno (90  $\mu$ m de tamanho) inibiu as taxas de eclosão dos ovos, diminuiu as taxas de crescimento das larvas e alterou respostas inatas dos animais; estes na presença de microplásticos, não exibiram respostas anti-predatórias quando expostos a ameaças olfativas (o que causou um aumento das taxas de mortalidade por predação) e ingeriam preferencialmente microplásticos em vez de náuplios vivos de *Artemia* sp. (Lönnstedt e Eklöv, 2016).

Em geral, os resultados dos estudos que têm sido efetuados indicam que os microplásticos podem ter consequências negativas na *fitness* dos organismos e das populações. Alguns dos diferentes efeitos observados nos vários estudos, e interligações entre si, estão representados na Figura 1.



**Figura 1.** Efeitos biológicos dos microplásticos e interações entre si.

Além dos efeitos adversos causados pelas próprias partículas, os microplásticos podem conter outras substâncias tóxicas para os organismos (Hartmann *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016). Estas substâncias podem ser compostos químicos adicionados durante o fabrico dos plásticos (e.g. plastificantes, retardantes de chamas, metais), contaminantes acumulados durante a utilização dos plásticos e/ou acumulados aquando da permanência dos microplásticos no meio ambiente (Teuten *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2016). De facto, os microplásticos têm sido encontrados no meio aquático com quantidades consideráveis de contaminantes orgânicos hidrofóbicos (tais como bifenilos policlorados e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos) e metais suscitando grande preocupação sobre o seu papel como vetores de entrada destes contaminantes nas cadeias tróficas (Teuten *et al.*, 2009, Koelmans, 2015). Esta preocupação deve-se a três fatores: i) os microplásticos devido à sua elevada área superficial em relação ao volume apresentam uma elevada capacidade de sorção; ii) os microplásticos são incorporados por uma ampla variedade de organismos, podendo ser transferidos através da cadeia trófica e, por isso, pode ocorrer bioacumulação quer dos microplásticos quer dos outros agentes químicos que eles contêm e iii) uma vez ingeridos ou incorporados de outras formas, os microplásticos podem ser transportados para dentro das células, aumentando o grau de exposição ao contaminante (s) (Endo e Koelmans, 2016; Syberg *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016; Wright *et al.*, 2013a). Contudo, os ensaios laboratoriais realizados até

à data com plásticos contaminados com compostos orgânicos hidrofóbicos pré-ab/adsorvidos e organismos “limpos” (o que favorece a desorção do contaminante dentro do organismo) mostram que os efeitos dos microplásticos na bioacumulação destes compostos são baixa magnitude; e, por outro lado, os efeitos ecotoxicológicos observados, nomeadamente a nível celular e subcelular, devem-se principalmente aos próprios microplásticos e não aos compostos orgânicos hidrofóbicos pré-ab/adsorvidos (Koelmans, 2015; Ziccardi *et al.*, 2016). Para além disso, tem sido recentemente defendido que, no meio natural, o papel dos microplásticos como vetores de compostos orgânicos hidrofóbicos é negligenciável em comparação com outras fases sólidas, tais como presas naturais e matéria particulada em suspensão (Hartmann *et al.*, 2017; Koelmans *et al.*, 2015).

A presença de microplásticos no meio ambiente pode influenciar a toxicidade de outros contaminantes ambientais, na medida em que os microplásticos podem representar, por um lado, um *stress* adicional com o qual os organismos têm que lidar (Besseling *et al.*, 2014) e, por outro, podem atuar nos mesmos alvos biológicos dos compostos químicos (Lambert e Wagner, 2016; Syberg *et al.*, 2015). Por exemplo, foi mostrado recentemente que a presença de microplásticos (1 – 5 µm; 0,184 mg/l) na água pode aumentar ou diminuir (dependendo da temperatura) a toxicidade do antibiótico cefalexina (coeficiente octanol-água de 0,65 unidades) na performance predatória de juvenis de *P. microps*, entre outros efeitos (Fonte *et al.*, 2016). É necessário, deste modo, gerar mais conhecimento científico acerca dos efeitos das misturas de microplásticos com outros contaminantes, quer sejam estes últimos hidrofóbicos ou hidrofílicos, clássicos ou emergentes e, em particular, em parâmetros que se espera que afetem diretamente as populações, tais como sobrevivência, crescimento e reprodução (Phuong *et al.*, 2016; Ziccardi *et al.*, 2016). Além disso, devido ao reduzido número de estudos ecotoxicológicos de microplásticos em espécies de água doce, e em particular em associação com outros contaminantes, mais estudos são necessários com estes organismos e, especialmente, em misturas com xenobióticos comumente encontrados nos ecossistemas de água doce (Lambert e Wagner, 2016; Wagner *et al.*, 2014).

## 1.2. Dimetoato

O dimetoato é um pesticida organofosforado de ação sistémica e de contacto que tem vindo a ser empregue desde os anos 50 do século XX no combate a pragas de insetos e ácaros em áreas agrícolas e urbanas (Dogan e Can, 2011 e Dogan *et al.*,

2011). Em Portugal, por exemplo, foi o segundo inseticida e acaricida mais vendido em 2011 (DGADR, 2011). O mecanismo primário de ação do dimetoato é a inibição da AChE (Frasco e Guilhermino, 2002; Scoy *et al.*, 2016). A AChE tem como função catalisar a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina em colina e ácido acético nas sinapses colinérgicas, logo, a sua inibição pelo dimetoato causa uma estimulação excessiva do sistema nervoso, podendo causar a morte do organismo (Anderson e Coats, 2012; Barata *et al.*, 2001; Guilhermino *et al.*, 2000).

O dimetoato é um pesticida não iónico, solúvel em água, por isso, uma vez presente no solo, é dissolvido na solução do solo e fracamente retido por processos de sorção (Gevao *et al.* 2000; Scoy *et al.*, 2016). O dimetoato é, desta forma, propenso a contaminar massas de água superficiais através de escoamento superficial ou por drenagem, podendo estas massas de água também serem contaminadas através de derrames acidentais ou propositados (Aktar *et al.*, 2009; Scoy *et al.*, 2016). Tanto no solo como no meio aquático, as principais vias de degradação do dimetoato são via hidrólise e biodegradação anaeróbia (Scoy *et al.*, 2016; WHO, 2004). O dimetoato é moderadamente estável à biodegradação, já a sua taxa de hidrolisação é dependente do pH (por exemplo, em soluções aquosas com pH entre 2 e 7, o seu tempo de semivida é de 193 dias, ao passo que em soluções aquosas com pH = 9, é de 12 dias) (Scoy *et al.*, 2016). Na Tabela 1.2. estão apresentadas as propriedades físico-químicas deste pesticida.

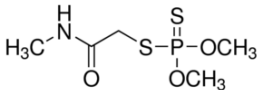
O dimetoato tem sido detetado em vários ecossistemas de água doce. Por exemplo, nas bacias hidrográficas do Vale Central da Califórnia (EUA) foi detetada uma concentração máxima de 11,31 µg/l (Lisker *et al.*, 2013) e no Lago Amvrackia (Grécia) foi detetado um valor máximo de 0,0685 µg/l (Thomatou *et al.*, 2013). Em amostras de sedimentos do Rio Tisa (tributário do Rio Danúbio) foi reportado um valor máximo de 1,2 µg/g de sedimento (Radović *et al.*, 2015). O dimetoato foi igualmente detetado em vários rios portugueses, com concentrações na água entre 0,1 e 1,0 µg/l (Tauler *et al.*, 2001).

Na literatura, têm sido referidos diversos efeitos subletais resultantes da exposição a dimetoato em organismos de água doce. Por exemplo, no rotífero *Brachionus calyciflorus*, exposição a concentrações entre 0,2 e 1,8 mg/l de dimetoato, durante 120 min e 6 h inibiu significativamente a velocidade natatória e as taxas de ingestão (Chen e Guo, 2015; Chen *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2012). Em adultos da truta-arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*), exposição durante 15 a 30 dias a concentrações entre 0,07 e 0,73 mg/l de dimetoato (Formulação comercial de 400 mg/l) causou *stress* oxidativo, efeitos genotóxicos, provocou um aumento significativo dos níveis de



biomarcadores de injúria hepática e diminuiu o índice hepatossomático (Dogan e Can, 2011; Dogan *et al.*, 2011).

**Tabela 2.** Propriedades físico-químicas do dimetoato. Compilação baseada em Scoy *et al.*, 2016 e WHO, 2004.

<b>Estrutura molecular</b>	
<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>
<b>Número CAS</b>	60-51-5
<b>Peso molecular (g/mol)</b>	229,3
<b>Densidade (g/ml)</b>	1,31
<b>Solubilidade em água a 21 °C (mg/l)</b>	39 800
<b>Pressão de vapor a 25 °C (mPa)</b>	0,247
<b>Constante da Lei de Henry a 25 °C (Pa.m<sup>3</sup>.mol<sup>-1</sup>)</b>	1,42 x 10 <sup>-6</sup>
<b>Coeficiente de partição octanol-água a 20 °C, pH 7 (logK<sub>oa</sub>)</b>	0,70

### 1.3. Objetivos da Dissertação

A presente Dissertação teve como objetivo central investigar os efeitos de microplásticos isoladamente e em misturas com dimetoato no microcrustáceo de água doce *D. magna*. Foram testadas as seguintes hipóteses nulas: H0<sub>1</sub> - Microsféricas de plástico (1 – 5 µm de diâmetro) em concentrações até 1,25 mg/l não induzem efeitos letais em *D. magna* após exposição de 96 h através do meio de teste; H0<sub>2</sub> - Concentrações de 0,05 mg/l e 0,1 mg/l de microplásticos (1 – 5 µm de diâmetro) não induzem toxicidade crônica em *D. magna* e H0<sub>3</sub> - A presença de microplásticos (1 – 5 µm de diâmetro) no meio não influencia a toxicidade crônica do dimetoato para *D. magna*.

*D. magna* foi escolhida como organismo teste pois é amplamente usada em ecotoxicologia como representante dos consumidores primários de água doce, os quais têm uma função determinante nestes ecossistemas (*i.e.*, controlam o fitoplâncton e são presas cruciais para níveis tróficos superiores, entre outros processos) e porque

apresenta várias características que a tornam adequada para este tipo de estudos, nomeadamente: reprodução partenogénica em condições laboratoriais, ciclo de vida curto, elevada fecundidade, fácil manutenção e manuseio em laboratório (Barata *et al.*, 2001; Guilhermino *et al.*, 2000; Koivisto, 1995; Wong *et al.*, 2009). Para além disso, *D. magna* é um organismo filtrador não seletivo e por isso é mais suscetível à captação de microplásticos do que organismos com outras estratégias de alimentação (Jemec *et al.*, 2017). Selecionaram-se microplásticos com 1 - 5 µm de diâmetro pois situam-se na gama de tamanho das células planctónicas de que *D. magna* tipicamente se alimenta, nomeadamente 1 – 50 µm (Ebert, 2005; Hidalgo-Ruz *et al.*, 2012; Phuong *et al.*, 2016). O dimetoato foi escolhido porque é um pesticida vulgarmente encontrado em ecossistemas de água doce, incluindo sistemas contaminados com microplásticos como é exemplo os rios Reno (Götz *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 2015; Mani *et al.*, 2015) e Danúbio (Lechner *et al.*, 2014; Radović *et al.*, 2015) na Europa e o rio Yangtze na China (Gao *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2015). Assim, o biota destes e doutros ecossistemas pode estar simultaneamente exposto a estes dois contaminantes.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Substâncias químicas

As substâncias testadas foram o dicromato de potássio, com um grau de pureza de 99,9% (ENSURE<sup>®</sup>, Merck, Alemanha), o dimetoato, com um grau de pureza de 99,5% (PESTANAL<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich, Alemanha) e microesferas de plástico, fluorescentes e de cor vermelha, com 1 - 5 µm de diâmetro (em média 2 µm de diâmetro), 1,3 g/cm<sup>3</sup> de densidade e com comprimentos de onda de excitação e de emissão de 575 e 607 nm, respetivamente, de acordo com as indicações do fabricante (Cospheric – Innovations in Microtechnology, EUA). Segundo o fabricante, 1 mg do produto contém  $1,836 \times 10^8$  microesferas.

Todas as substâncias químicas usadas nas culturas de *D. magna* e de *Chlorella vulgaris* foram de grau analítico (Sigma-Aldrich ou Merck, Alemanha).

### 2.2. Cultura de *C. vulgaris* e preparação do alimento para *D.magna*

A metodologia seguida na manutenção das culturas de *C.vulgaris* está descrita em Guilhermino (1996), apresentando-se de seguida uma descrição resumida. Todo o material e meio de cultura usado para a manutenção das culturas foi previamente esterilizado em autoclave (Uniclave 77 ou 88, AJC, Portugal) durante 60 min a  $120 \pm 1^\circ\text{C}$ , e as culturas foram sempre manuseadas em condições assépticas. O meio de cultura da microalga utilizado foi o meio “Woods Hole MBL” (MBL) (Stein, 1973). Este meio foi preparado pela adição sucessiva de soluções de nutrientes e de tampão de tris(hidroximetil)aminometano a 4 l de água destilada (Anexo I). As culturas foram iniciadas adicionando ao meio MBL esterilizado 0,5 ml de uma solução de vitaminas (preparada conforme descrito no Anexo III) e 10 ml de inóculo líquido de *C. vulgaris*. As culturas foram submetidas a arejamento contínuo com ar filtrado através de filtros de 0,22 µm (Millex-GS<sup>®</sup>, Merck Millipore, Alemanha) e mantidas em sala climatizada, com temperatura de  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 24 h luz. Quando, ao sétimo dia, as culturas atingiam a fase exponencial de crescimento, retiravam-se por diferenças de pressão 2 l da cultura e adicionavam-se 2 l de meio MBL previamente esterilizado e enriquecido conforme descrito anteriormente. Este processo foi repetido em intervalos de 48 h e as culturas foram mantidas por um período máximo de 30 dias. Ocasionalmente, no início da fase exponencial de crescimento das culturas, retiravam-se pequenos volumes que

serviam de inóculos para futuras culturas. Estes inóculos foram conservados a cerca de 4 °C até a data da sua utilização.

As culturas de *C. vulgaris* foram utilizadas na alimentação de *D. magna*. Para o efeito, os volumes retirados de cada cultura foram centrifugados durante 7 min a 3500 rpm (Kubota 5400, Japão). O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento contendo as células de *C. vulgaris* foi ressuspendido em meio de água dura ASTM (do inglês, *American Society for Testing and Materials*) (ASTM, 1980), com pH próximo de 8,48, doravante designado por meio ASTM (Anexo II), enriquecido com 2 ml da solução de vitaminas descrita no Anexo III, doravante designado por meio ASTM com vitaminas. Uma amostra da suspensão de algas assim obtida foi diluída na proporção 1/10 (v/v) e a sua absorvância foi lida a 440 nm (SpectraMax M2°, Molecular Devices, EUA). Caso o valor da absorvância fosse superior a 0,800 unidades de densidade ótica (D.O.), a amostra era diluída e o processo era repetido até ser obtido um valor entre 0,400 e 0,800 unidades de D.O. de modo a poder ser utilizado no cálculo do número de células presente na suspensão através de um modelo de regressão linear previamente estabelecido e em uso no laboratório: concentração (células/ml) =  $-155820 + \text{absorvância (unidades de D.O.)} \times 13144324 \times \text{fator de diluição}$ . A suspensão foi conservada a cerca de 4 °C e utilizado como alimento para *D. magna* durante um período máximo de 3 dias. Quando preparado em excesso, foi armazenado a -20 °C por um período máximo de 3 meses e utilizado sempre que as culturas de *C. vulgaris* não se encontravam em condições adequadas a serem utilizadas como alimento fresco para *D. magna*.

### **2.3. Culturas parentais de *D.magna***

As experiências foram realizadas com *D. magna*, clone A (*sensu* Baird *et al.*, 1989a), mantido em cultura desde há vários anos no Laboratório de Ecotoxicologia do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS) da Universidade do Porto e nas instalações do Grupo de Investigação em Ecotoxicologia, Ecologia do Stresse e Saúde Ambiental do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR) da Universidade do Porto.

Nas culturas de *D. magna* seguiu-se um protocolo existente há várias décadas no laboratório e cujo resumo se encontra descrito em várias publicações (e.g. Diamantino *et al.*, 2000; Guilhermino *et al.*, 2000), apresentando-se de seguida uma breve descrição. As culturas parentais em grupo e individuais de *D. magna* foram iniciadas a partir de juvenis

da terceira à quinta ninhada provenientes de fêmeas de culturas pré-existentis mantidas a  $20 \pm 1$  °C. Nas culturas em grupo, doze juvenis foram colocados em recipientes de vidro de 1 l de capacidade, parcialmente tapados, contendo 800 ml de meio ASTM com vitaminas (Bradley *et al.*, 1993) e 3,2 ml de um extrato de *Ascophyllum nodosum* (Baird *et al.*, 1989b; Anexo C). Nas culturas individuais, os juvenis foram colocados individualmente em recipientes de vidro de 200 ml de capacidade, parcialmente tapados, contendo 100 ml de meio ASTM com vitaminas e 0,4 ml de extrato de *A. nodosum*. Os animais foram alimentados diariamente com *C. vulgaris* com  $3 \times 10^5$  células da microalga/ml/. O meio das culturas foi renovado três vezes por semana e os animais foram mantidos no máximo até à quinta ninhada. As culturas foram mantidas em sala climatizada, com temperatura de  $20 \pm 1$  °C e fotoperíodo de 16 h luz : 8 h escuro.

De forma a avaliar a sensibilidade dos organismos de teste foi realizado um ensaio de toxicidade aguda com o dicromato de potássio (secção 2.4.1) (OECD,2004).

#### **2.4. Metodologia para determinação das concentrações de dicromato de potássio e microplásticos no meio de teste**

A fim de se poderem determinar as concentrações reais de exposição do bioensaio agudo com o dicromato de potássio para avaliação do estado de saúde das culturas parentais de *D. magna* por espectrofotometria UV-Visível (UV-Vis) e com base na concentração de crómio (Cr(VI)), foi implementada a metodologia descrita em Luís *et al.*, (2015) e baseada em Sena *et al.*, (2000), para o meio de teste utilizado (ASTM sem vitaminas, pH  $\approx$  8,48). Em todas as leituras de absorvância, foi utilizado o espectrofotómetro SpectraMax M2<sup>®</sup> (Molecular Devices, EUA) e o *software* SoftMax<sup>®</sup> Pro. Em dias diferentes, foram preparadas três soluções independentes de dicromato de potássio em meio ASTM sem vitaminas com concentrações nominais de Cr(VI) de 7,1 mg/l. De seguida, foi determinado o espectro de cada uma destas soluções com o intuito de se determinar o comprimento de onda correspondente ao pico de absorvância máximo ( $\lambda_{\text{máx}}$ ). Seguidamente, foram preparadas cinco soluções independentes e em dias diferentes com uma concentração nominal de Cr(VI) de 7,1 mg/l; três em meio ASTM sem vitaminas e duas em água ultrapura (u.p.) (Milli-Q<sup>®</sup>, Merck Millipore, Alemanha) com pH básico. Cada uma destas soluções foi de seguida diluída no respetivo meio de forma a serem obtidas séries de soluções com concentrações de 0,18; 0,35; 0,71; 0,88; 1,06; 1,24 e 1,41 mg/l. A absorvância destas soluções foi determinada a 372 nm ( $\lambda_{\text{máx}}$

previamente determinado). A água u.p. com pH básico ( $\approx$  pH 9,96) foi preparada por adição de uma alíquota de NaOH 3 M a água u.p. ( $\approx$  pH 6,15). Antes de se proceder à determinação da absorvância no meio água u.p com pH básico, foi imediatamente antes determinado o espectro de uma solução de Cr(VI) de 7,1 mg/l preparada neste meio de forma a confirmar-se o  $\lambda_{\text{máx}}$  a 372 nm. Todas as medições foram efetuadas numa cuvete de quartzo de 1,00 cm a 25 °C. Para cada série de soluções foi elaborada um curva de calibração fazendo corresponder a absorvância de cada solução à sua concentração nominal de Cr(VI) e determinado o coeficiente de correlação de Spearman ( $r_s$ ) (Zar,2010). Obtiveram-se correlações significativas e positivas entre as variáveis, quer para as soluções em ASTM (N = 24,  $r_s = 0,995$ ,  $p = 0,000$ ) quer para as soluções em água u.p. com pH básico (N = 16,  $r_s = 0,995$ ,  $p = 0,000$ ). Foi então ajustado um modelo de regressão linear simples para cada meio, utilizando a absorvância como variável independente e a concentração de Cr(VI) como variável dependente (Zar,2010). Seguidamente, de forma a validar o método proposto nas condições utilizadas, foram estudados os parâmetros analíticos linearidade, especificidade, limite de deteção e limite de quantificação (ICH, 2005). A linearidade foi estudada através do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) (Zar, 2010). A especificidade foi avaliada estatisticamente por comparação dos modelos de regressão linear simples em meio ASTM (meio 1) e em água u.p. com pH básico (meio 2) (ver secção 2.6) e, ainda, por comparação visual dos espectros de três soluções independentes de Cr(VI) (7,1 mg/l) preparadas em meio ASTM sem vitaminas com os espectros do meio ASTM sem vitaminas (apenas) (Karnes *et al.*, 1991). O limite de deteção e limite de quantificação foram calculados a partir das seguintes equações (ICH, 2005; Shrivastava e Gupta, 2011):

$$\text{Limite de deteção} = \frac{3s}{b} \quad (\text{Equação 2.1})$$

$$\text{Limite de quantificação} = \frac{10s}{b} \quad (\text{Equação 2.2})$$

onde,  $s$  é o erro padrão da estimativa e  $b$  o coeficiente de regressão.

As concentrações dos microplásticos fluorescentes utilizados neste estudo são passíveis de serem determinadas em meios aquosos por espectrofluorimetria (Ferreira *et al.*, 2015; Fonte *et al.*, 2016; Luís *et al.*, 2015), utilizando um comprimento de onda de excitação de 575 nm e um comprimento de onda de emissão de 607 nm, conforme recomendado pelo fabricante dos microplásticos usados no presente estudo. Foram preparadas seis soluções coloidais (doravante designadas por soluções) independentes e

em dias diferentes com uma concentração nominal de microplásticos de 50 mg/l; três em meio ASTM sem vitaminas e três em água u.p. Cada uma destas soluções foi de seguida diluída no respetivo meio de forma a serem obtidas séries de soluções com concentrações de 0,03; 0,23; 0,43; 0,63; 0,83; 1,03; 1,23 e 1,43 mg/l. Segundo o fabricante, não é necessário o uso de surfactantes para obter a solução coloidal das partículas em meios aquosos. A fluorescência destas soluções foi de seguida medida por espectrofluorimetria usando o espectrofluorímetro SpectraMax M2<sup>®</sup> (Molecular Devices, EUA) e o *software* SoftMax<sup>®</sup> Pro. As medições foram efetuadas numa cuvete de quartzo de fluorescência a 25 °C. Para cada série de soluções foi elaborada uma curva de calibração fazendo corresponder a fluorescência de cada solução à sua concentração nominal de microplásticos e determinado o coeficiente de correlação de Spearman ( $r_s$ ) (Zar, 2010). Obtiveram-se correlações significativas e positivas entre as variáveis, quer para as soluções em ASTM (N = 24,  $r_s$  = 0,993, p = 0,000) quer para as soluções em água u.p. (N = 24,  $r_s$  = 0,993, p = 0,000). Foi então ajustado um modelo de regressão linear simples, utilizando a fluorescência como variável independente e a concentração de microplásticos como variável dependente. Tal como descrito anteriormente, a linearidade foi avaliada através do coeficiente de determinação e os limites de deteção e quantificação foram determinados aplicando as equações 2.1 e 2.2, respetivamente. A especificidade foi avaliada estatisticamente por comparação dos modelos de regressão linear simples em meio ASTM (meio 1) e em água u.p. com pH básico (meio 2) (ver secção 2.6).

## 2.5. Bioensaios agudos

Para efetuar os bioensaios agudos para avaliação da toxicidade do dicromato de potássio, dos microplásticos e do dimetoato seguiu-se o procedimento geral descrito na norma da OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico) nº 202 “*Daphnia sp. Acute Immobilisation Test*” (OECD, 2004). Todos os ensaios foram iniciados com juvenis com mais de 6 h e menos de 24 h de idade, da terceira à quinta ninhada, produzidos por progenitoras saudáveis. Os recipientes usados para expor os organismos às substâncias de teste foram frascos de vidro com aproximadamente 100 ml de capacidade e cerca de 4 cm de diâmetro e 11 cm de altura. Em todos os ensaios agudos, o meio de teste foi ASTM sem vitaminas e sem *A. nodosum*. Os juvenis não foram alimentados durante os ensaios e os recipientes de teste foram semitapados com tampas metálicas de forma a permitir a passagem do ar e a evitar possíveis contaminações. Os ensaios decorreram em sala climatizada com temperatura de 20 ± 1 °C e fotoperíodo de 16 h luz : 8 h escuro.

### 2.5.1. Bioensaio agudo para avaliação da toxicidade de dicromato de potássio

A norma da OCDE nº 202 “*Daphnia sp. Acute Immobilisation Test*” recomenda que a sensibilidade dos organismos de teste seja previamente avaliada através da determinação da concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>) de uma substância de referência. Uma substância de referência tipicamente usada em bioensaios é o dicromato de potássio (Persoone *et al.*, 2009; OECD, 2004; OECD, 2006). As concentrações nominais de dicromato de potássio testadas foram 0,70; 0,84; 1,00; 1,21; 1,45; 1,74; 2,08; 2,5 e 3,0 mg/l. As soluções de teste foram preparadas em meio ASTM sem vitaminas a partir de diluições apropriadas de uma solução de 100 mg/l de dicromato de potássio preparada em meio ASTM. Para cada tratamento foram distribuídos aleatoriamente 20 organismos por quatro recipientes de teste (cinco em cada recipiente). Cada recipiente continha 50 ml de meio de teste ou ASTM apenas (controle). O ensaio teve uma duração de 48 h durante as quais o meio de teste não foi renovado. O critério de efeito foi a morte avaliada através da imobilização dos juvenis quando expostos durante 15 s a um estímulo luminoso. A imobilização dos juvenis foi determinada a cada 24 h. Às 0, 24 e 48 h, foram determinados o pH, a temperatura e a concentração de oxigénio dissolvido no meio de teste em todos os recipientes de teste através de um medidor multiparamétrico portátil (WTW Multi 340i/SET, Alemanha). No início do ensaio e após 48 h foram recolhidas amostras de meio de todos os recipientes para determinação das concentrações reais de exposição de dicromato de potássio no início e final do ensaio, utilizando a metodologia descrita em 2.3. As concentrações reais de Cr(VI) no início do ensaio foram estimadas a partir do modelo de regressão linear ajustado aos dados da curva de calibração do Cr(VI) em meio ASTM sem vitaminas (ver secção 2.3). As concentrações reais de dicromato de potássio foram estimadas a partir das concentrações reais de Cr(VI). O desvio médio (%) das concentrações reais de dicromato de potássio em relação às nominais foi calculado a partir das concentrações reais através da fórmula:  $\text{módulo de } 100 - (\text{concentração real} \times 100 / \text{concentração nominal})$  (Luís *et al.*, 2015). O potencial decaimento (%), isto é, o decréscimo da concentração da substância testada no meio de teste durante o ensaio, foi calculado com base na média da absorvância no início e no final do ensaio de acordo com a fórmula:  $(\text{média absorvância às 0 h} - \text{média da absorvância às 48 h}) \times 100 / \text{média da absorvância às 0 h}$  (Luís *et al.*, 2015).

### 2.5.2. Bioensaio agudo para avaliação da toxicidade de dimetoato



As concentrações nominais de dimetoato testadas foram 0,2; 0,5; 0,8; 1,1; 1,4; 1,7; 2,0 e 2,3 mg/l. As soluções de teste foram preparadas em meio ASTM sem vitaminas a partir de diluições apropriadas de uma solução preparada em ASTM com uma concentração de 200 mg/l de dimetoato. Dado que a solubilidade do dimetoato em água a 21 °C é de 39 800 mg/l, não foram usados solventes na dissolução do composto no meio de teste (Scoy *et al.*, 2016). Para cada tratamento foram distribuídos aleatoriamente 20 organismos por quatro recipientes de teste (cinco em cada recipiente). Cada recipiente continha 50 ml de meio de teste ou ASTM apenas (controle). De forma a selecionar as concentrações de dimetoato a testar no bioensaio crónico, o período de exposição foi prolongado de 48 h para 96 h. Ao longo das 96 h, o meio de teste não foi renovado. O critério de efeito foi a morte avaliada através da imobilização dos juvenis quando expostos durante 15 s a um estímulo luminoso. A imobilização dos juvenis foi determinada a cada 24 h. O pH, a temperatura e a concentração de oxigénio dissolvido foram medidos em todos os frascos de teste através de multiparamétrico portátil (HQ30d, Hach, EUA) apenas às 0, 48 e 96 h de forma a causar o menor stresse possível aos organismos.

### **2.5.3. Bioensaio agudo para avaliação da toxicidade de microplásticos**

As concentrações nominais de microplásticos testadas foram 0,05; 0,35; 0,65; 0,95 e 1,25 mg/l (o número de partículas por litro em cada concentração testada está apresentado na Tabela A.1). As soluções de teste foram preparadas em meio ASTM sem vitaminas a partir de diluições apropriadas de uma solução de 50 mg/l de microplásticos preparada em ASTM. A solução de microplásticos de 50 mg/l foi preparada diariamente e agitada vigorosamente. Para cada tratamento foram distribuídos aleatoriamente 20 organismos por quatro recipientes de teste (cinco em cada recipiente). Cada recipiente continha 50 ml de meio de teste ou ASTM apenas (controle). O período de exposição foi prolongado de 48 para 96 h. O critério de efeito foi a morte avaliada através da imobilização dos juvenis quando expostos durante 15 s a um estímulo luminoso. O meio de teste foi renovado a cada 24 h e os organismos imóveis retirados aquando da sua observação. Diariamente e em ambos os meios (novo e velho) foram determinados o pH, a temperatura e a concentração de oxigénio dissolvido no meio de teste em todos os frascos de teste através de um medidor multiparamétrico portátil (HQ30d, Hach, EUA). Ao fim das 96 h, a fim de serem tiradas fotografias, alguns organismos foram transferidos para microtubos plásticos onde foi removido o excesso de meio e adicionadas algumas gotas de água u.p. de forma a diluir a concentração de microplásticos; de seguida, os

organismos foram colocados em lâminas, fixados com etanol a 70% (v/v) e fotografados usando um microscópio (Leica CTR 6000, Leica Microsystems, Alemanha) ligado a uma câmara digital (Leica DFC 300 FX, Leica Microsystems, Alemanha). O *software* usado foi o LAS AF Lite (Leica Microsystems, Alemanha).

## **2.6. Bioensaio crónico para avaliação da toxicidade de microplásticos e de dimetoato, isoladamente e em misturas**

De forma a avaliar a toxicidade crónica de microplásticos e de dimetoato, isoladamente e em misturas, em *D. magna*, foi realizado um ensaio crónico com base na norma da OCDE nº 211 “*Daphnia magna* Reproduction Test” (OECD, 2012). Os tratamentos testados foram: controlo; 0,05 mg/l de microplásticos; 0,1 mg/l de microplásticos; 0,125 mg/l de dimetoato; 0,25 mg/l de dimetoato; 0,05 mg/l de microplásticos + 0,125 mg/l de dimetoato; 0,05 mg/l de microplásticos + 0,25 mg/l de dimetoato; 0,1 mg/l de microplásticos + 0,125 mg/l de dimetoato e 0,1 mg/l de microplásticos + 0,25 mg/l de dimetoato (o número de partículas por litro nas concentrações de microplásticos testadas está apresentado na Tabela A.2). O meio de teste foi ASTM com vitaminas enriquecido com 0,4 ml de extrato de *A. nodosum*. Diariamente, foi preparada e agitada vigorosamente uma solução de microplásticos em meio ASTM com vitaminas com uma concentração nominal de 100 mg/l de microplásticos, a qual foi diluída com o mesmo meio de forma a serem obtidas as concentrações nominais de exposição requeridas. As soluções de teste de dimetoato foram preparadas em meio ASTM com vitaminas a partir de diluições apropriadas de uma solução de reserva de 50 mg/l de dimetoato. Devido à taxa de degradação do dimetoato moderadamente elevada em meios alcalinos (Scoy *et al.*, 2016), a solução de reserva deste composto foi preparada em água u.p. (pH  $\approx$  6,15) e conservada a 4 °C por um período máximo de 8 dias. As misturas de teste foram preparadas através de diluições apropriadas da solução de teste mais concentrada dos microplásticos e da solução de reserva do dimetoato. O teste foi iniciado com juvenis com mais de 6 h e menos de 24 h de idade, provenientes da quinta ninhada de fêmeas saudáveis. Para cada tratamento foram expostos individualmente cinco animais (i.e. um animal por recipiente). Cada recipiente continha 50 ml de meio de teste (com uma ou duas substâncias tóxicas) ou apenas ASTM com vitaminas (controlo). Os recipientes foram frascos de vidro com aproximadamente 100 ml de capacidade e cerca de 4 cm de diâmetro e 11 cm de altura. No decorrer do ensaio, os recipientes de teste foram semitapados com tampas metálicas de forma a permitir a passagem do ar e evitar possíveis contaminações. Os animais

foram alimentados diariamente com um volume de suspensão de *C. vulgaris* correspondente  $3 \times 10^5$  células/ml e o ensaio teve uma duração de 21 dias, durante os quais o meio de teste foi renovado diariamente. Aquando da renovação do meio de teste, os frascos de teste foram verificados para deteção de progenitoras imóveis contagem do número de descendentes produzidos (juvenis móveis, imóveis e ovos abortados). Adicionalmente, as primeiras e últimas carapaças libertadas pelas progenitoras foram recolhidas para microtubos plásticos e conservadas a -20 °C para a sua posterior medição num estereoscópio (Nikon SMZ800, Nikon Instruments, Japão). Diariamente foram determinados o pH, a temperatura e a concentração de oxigénio dissolvido no meio de teste em um frasco de teste por tratamento, em ambos os meios (novo e velho), através de um medidor multiparamétrico portátil (HQ30d, Hach, EUA). O ensaio decorreu em sala climatizada com temperatura de  $20 \pm 1$  °C e fotoperíodo de 16 h luz:8 h escuro. Os parâmetros reprodutivos analisados foram: idade de libertação da primeira ninhada, o número total de juvenis, número de juvenis móveis e número de ovos abortados. O crescimento somático foi calculado através da diferença entre o comprimento do primeiro exopodito da segunda antena medido na última carapaça e a mesma dimensão medida na primeira carapaça libertada por cada fêmea (Soares, 1989).

## 2.7. Análise estatística

Os dados das curvas de calibração de dicromato de potássio e de microplásticos bem como os dados do bioensaio agudo com os microplásticos e do bioensaio crónico foram testados quanto à distribuição normal (teste de Shapiro-Wilko) e homogeneidade das variâncias (teste de Levene) (Zar,2010).

A especificidade dos métodos analíticos para determinar as concentrações reais de Cr(VI) e microplásticos no meio de teste foi avaliada por comparação dos modelos de regressão linear simples (com replicação) em meio ASTM (meio 1) e em água u.p. com pH básico (meio 2) aplicando as seguintes hipóteses nulas (Zar, 2010): (i) as duas retas de regressão linear têm a mesmo declive. O teste estatístico aplicado foi

$$t = \frac{b_1 - b_2}{S_{b_1 - b_2}}$$

e (ii) as duas retas de regressão linear têm a mesma elevação. O teste estatístico aplicado foi

$$t = \frac{(\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2) - b_c(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{\sqrt{(s_{Y.X}^2)_c \left[ \frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2} + \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2}{A_c} \right]}}$$

onde

$$A_c = (\sum x^2)_1 + (\sum x^2)_2 ,$$

$$b_c = \frac{B_c}{A_c} ,$$

$$(s_{Y.X}^2)_c = \frac{SS_c}{DF_c} ,$$

$$B_c = (\sum xy^2)_1 + (\sum xy^2)_2 ,$$

$$SS_c = \frac{C_c - B_c^2}{A_c} ,$$

$$C_c = (\sum y^2)_1 + (\sum y^2)_2$$

e

$$DF_c = N_1 + N_2 - 3$$

Relativamente aos ensaios agudos, a CL<sub>50</sub> e os respetivos intervalos de confiança a 95% foram determinados a partir das curvas de toxicidade (transformação probit das percentagens de imobilização *versus* o logaritmo das correspondentes concentrações de exposição) (Finney, 1971).

No bioensaio agudo com os microplásticos, as percentagens de mortalidade não cumulativa (n = 4) dos vários tratamentos foram comparadas entre si e individualmente entre os diferentes períodos de exposição (24, 48, 72 e 96 h) à semelhança de outros estudos com *D. magna* e microplásticos para avaliação da sua toxicidade aguda (Rehse *et al.*, 2016; Jemec *et al.*, 2016). Uma vez que os pressupostos da normalidade e homogeneidade de variâncias da Análise de Variância (ANOVA) não foram cumpridos, mesmo recorrendo a transformações dos dados, foi usado, para o efeito, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Quando foram encontradas diferenças significativas, foi usado o teste não paramétrico de multicomparações de Nemenyi (amostras com

tamanho igual) para discriminar tratamentos que induziram efeitos significativamente diferentes (Zar, 2010).

No bioensaio crónico, os dados do crescimento somático, número total de juvenis e número de juvenis imóveis satisfizeram os pressupostos da ANOVA (nomeadamente, a normalidade e homogeneidade de variâncias), pelo que foram analisados através de uma ANOVA de dois fatores (2-ANOVA) com interação (fatores fixos: microplásticos e dimetoato). Os dados da idade de libertação da primeira ninhada e do número de ovos abortados não satisfizeram a normalidade e homogeneidade de variâncias da ANOVA, mesmo recorrendo a transformações dos dados, pelo que se usou o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste não paramétrico de multicomparações de Dunn (amostras com tamanho diferente), quando foram encontradas diferenças significativas (Zar, 2010).

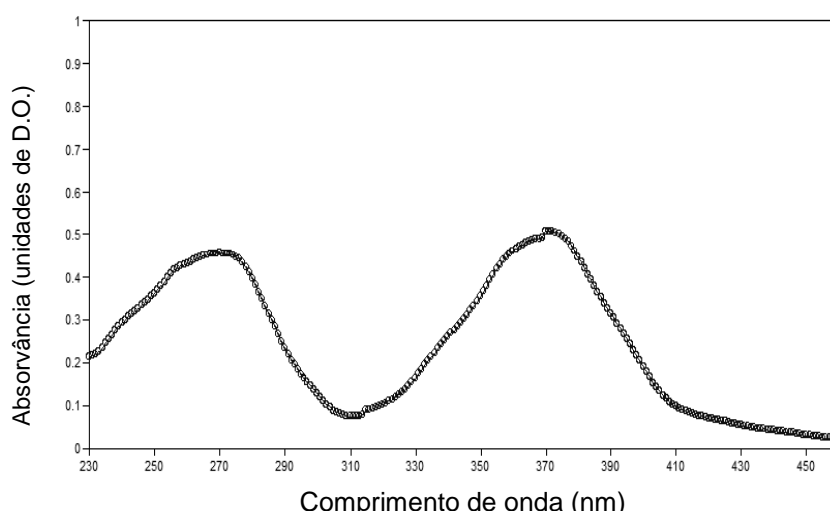
Na análise estatística foi usado o *software* IBM SPSS Statistics (versão 21) bem como as fórmulas originais dos testes e cálculos de acordo com Zar, 2010. O nível de significância foi 0,05.

### 3. RESULTADOS

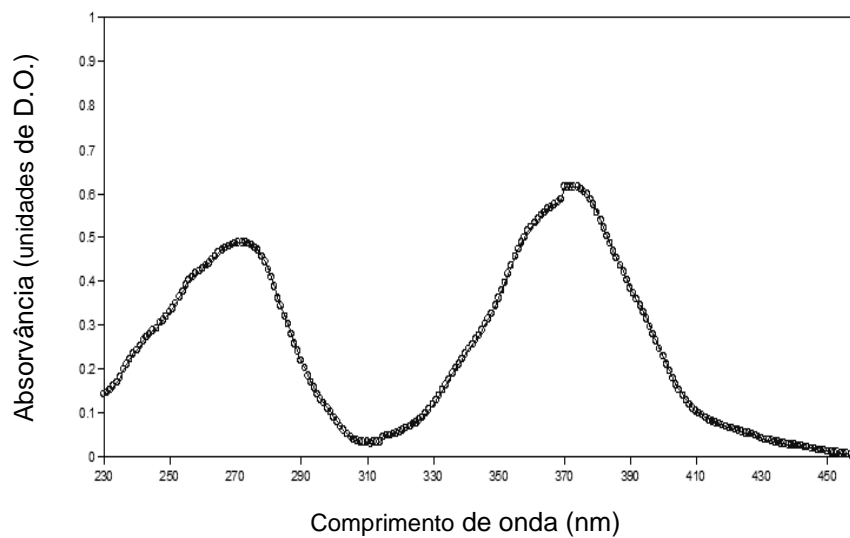
#### 3.1. Padronização dos métodos analíticos para determinação das concentrações reais de dicromato de potássio e microplásticos no meio de teste durante os bioensaios

Na Figura 2 apresentam-se os espectros de absorção de uma solução de Cr(VI) (7,1 mg/l) preparada em meio ASTM sem vitaminas (Figura 2.A) e de uma outra solução preparada em água u.p. com pH básico (Figura 2. B). Em ambos os espectros observam-se dois picos de absorvância: um a 272 nm e outro a 372 nm. O  $\lambda_{\text{máx}}$  ocorreu a 372 nm e, por isso, selecionou-se este comprimento de onda para leitura da absorvância das soluções destinadas à elaboração das curvas de calibração, as quais apresentam-se na Figura 3. Para as soluções preparadas em meio ASTM sem vitaminas, o modelo de regressão linear ajustado aos dados foi: concentração de Cr(VI) (mg/l) = 0,079 + 11,164 x absorvância (unidades de D.O.),  $R^2 = 98,0\%$ . Para a água u.p. com pH básico, o modelo de regressão linear ajustado aos dados foi: concentração de Cr(VI) (mg/l) = 0,076 + 11,103 x absorvância (unidades de D.O.),  $R^2 = 98,6\%$ . Comparando o espectro do meio ASTM sem vitaminas sem o dicromato de potássio (branco) apresentado na Figura 2.C com o espectro da solução de Cr(VI) com uma concentração de 7,1 mg/l de Cr(VI) preparada neste meio (Figura 2.A) constata-se a ausência dos picos de absorção do Cr(VI) no branco. Comparando os modelos de regressão linear do Cr(VI) no meio ASTM sem vitaminas e em água u.p. com pH básico, constata-se que os declives ( $t = 0,122$ ,  $t_{0,05(2),36} = 2,028$ ,  $P > 0,05$ ) e as interceções no eixo do Y ( $t = 0,431$  e  $t_{0,05(2),37} = 2,026$ ,  $P > 0,05$ ) das duas regressões não são significativamente diferentes. O limite de detecção e o limite de quantificação obtidos corresponderam a 0,02 mg/l e 0,05 mg/l, respetivamente.

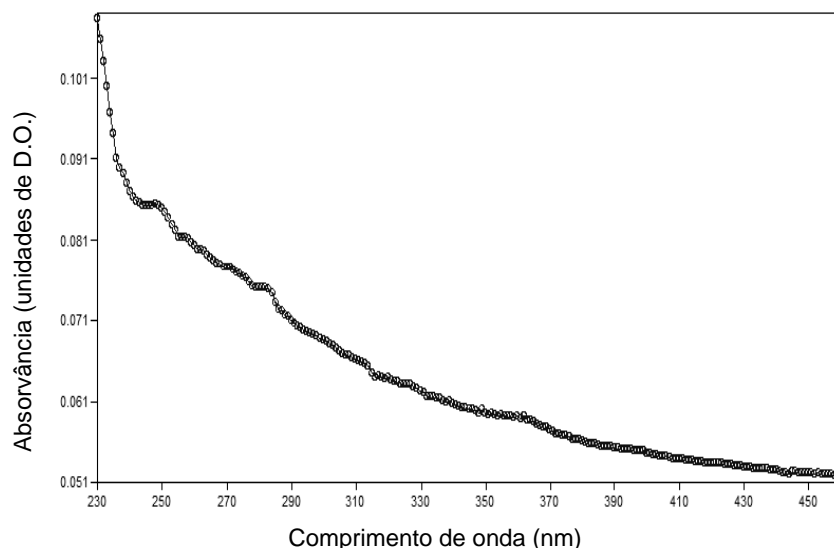
(A)



(B)

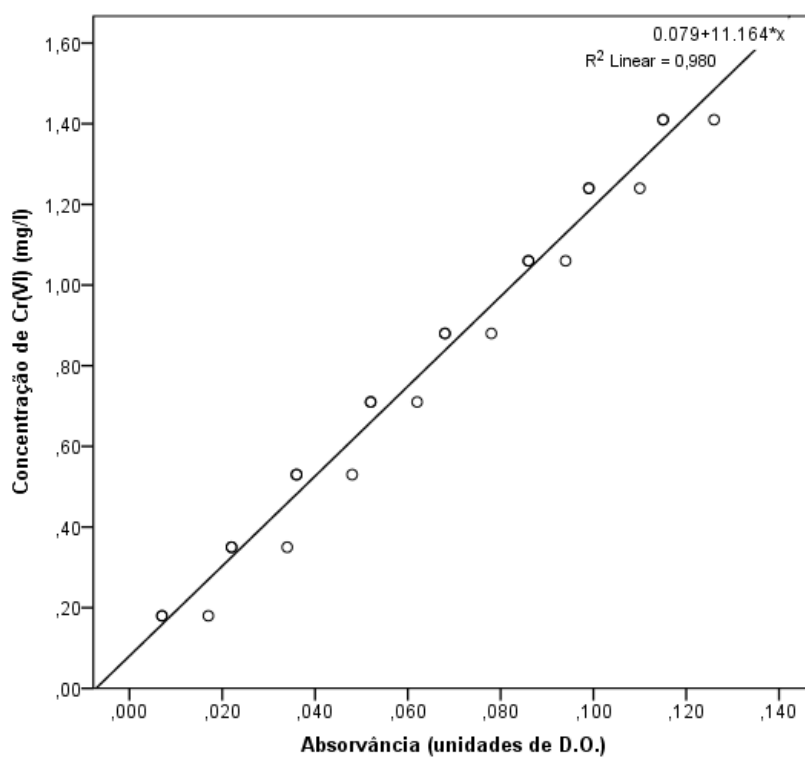


(C)

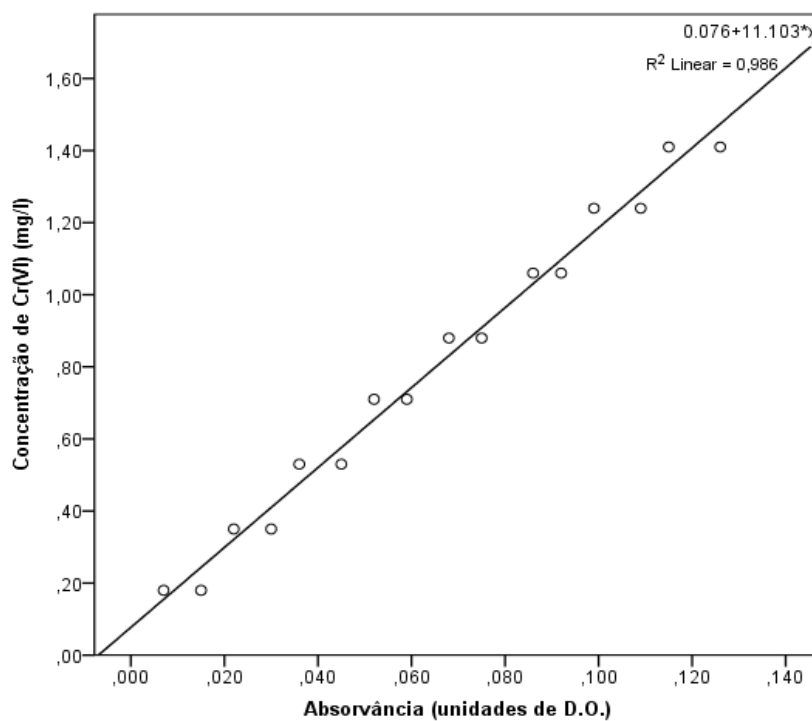


**Figura 2.** Espectros de absorção UV-visível das seguintes soluções: A – solução com uma concentração de 7,1 mg/l de Cr(VI) preparada em meio ASTM sem vitaminas; B – solução com uma concentração de 7,1 mg/l de Cr(VI) preparada em água ultrapura com pH básico e C – meio ASTM sem vitaminas ( $\text{pH} \approx 8,48$ ) e sem Cr(VI). D.O. – unidades de densidade ótica.

(A)



(B)

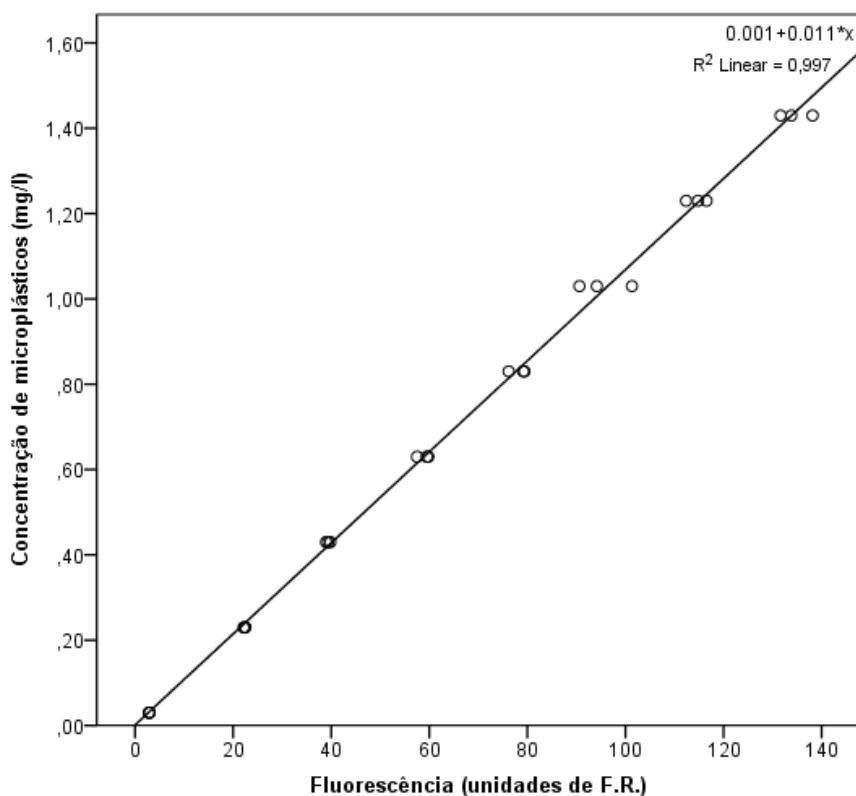


**Figura 3.** Modelo de regressão linear ajustado aos dados da concentração de Cr(VI) e da absorvância em meio ASTM sem vitaminas (A) e em água ultrapura com pH básico (B). o – concentrações das soluções de Cr(VI). D.O. – densidade ótica.  $R^2$  – coeficiente de

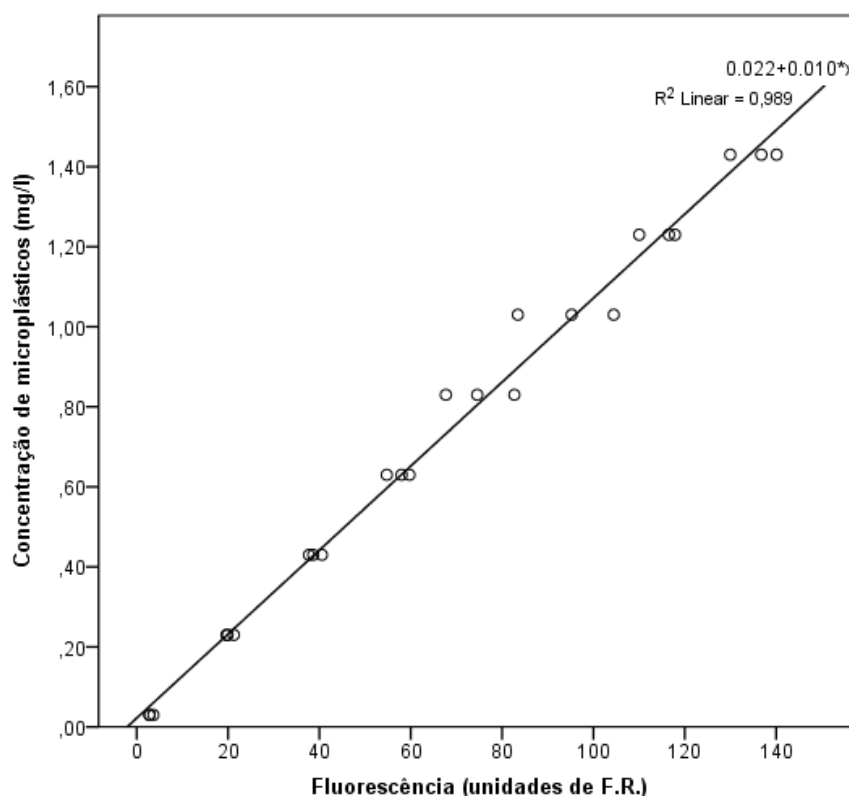


As curvas de calibração dos microplásticos em meio ASTM sem vitaminas e em água u.p. apresentam-se na Figura 4. Para o meio ASTM sem vitaminas, o modelo de regressão linear ajustado aos dados da curva de calibração foi: concentração de microplásticos (mg/l) =  $0,001 + 0,011 \times$  fluorescência (unidades de fluorescência relativa (F.R.)),  $R^2 = 99,7\%$ . Para a água u.p., o modelo de regressão linear ajustado aos dados foi: concentração de microplásticos (mg/l) =  $0,022 + 0,010 \times$  fluorescência (unidades de fluorescência relativa),  $R^2 = 98,9\%$ . Comparando os dois modelos de regressão linear, constata-se que os declives ( $t = 0,696$ ,  $t_{0,05(2),44} = 2,015$ ,  $P > 0,05$ ) e as interceções no eixo do Y ( $t = -0,798$ ,  $t_{0,05(2),45} = 2,014$ ,  $P > 0,05$ ) das duas regressões não são significativamente diferentes. O limite de detecção e o limite de quantificação obtidos corresponderam a 6,74 mg/l e 22,47 mg/l, respetivamente.

(A)



(B)



**Figura 4.** Modelo de regressão linear ajustado aos dados da concentração de microplásticos e da fluorescência em meio ASTM sem vitaminas (A) e em água ultrapura (B). o – concentrações das soluções de microplásticos. F.R.- fluorescência relativa.  $R^2$  - coeficiente de determinação.

### 3.2. Condições gerais dos bioensaios

Em todos os ensaios, a variação do pH do meio de teste foi inferior a 1,5 unidades de pH, a concentração de oxigénio dissolvido no meio de teste foi superior a 3 mg/l (Apêndice B) e a mortalidade nos grupos controlo foi inferior a 10%. A variação da temperatura do meio de teste foi inferior a 1 °C, à exceção do bioensaio agudo com o dicromato de potássio, a qual foi superior a 1 °C. (Apêndice B). No ensaio crónico, a média do número de descendentes móveis por progenitora no grupo controlo correspondeu a 67,9 juvenis.

### 3.3. Toxicidade aguda de dicromato de potássio para juvenis de *D. magna*

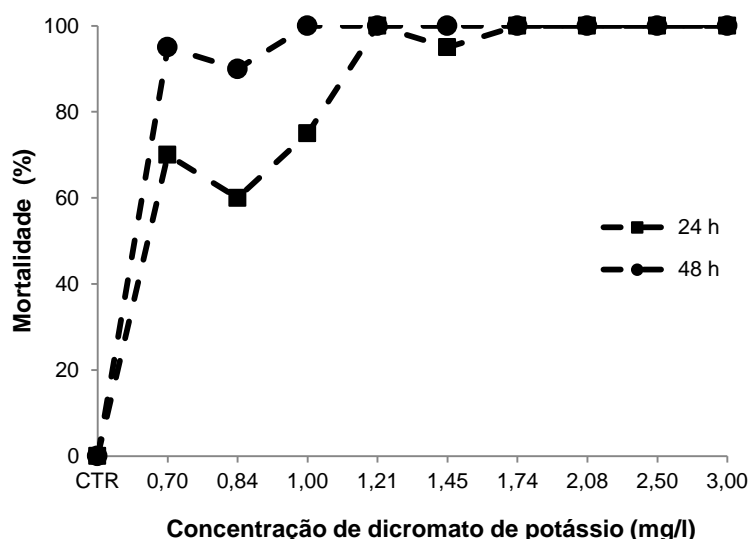
As concentrações reais de Cr(VI) no início do ensaio calculadas a partir do modelo de regressão linear ajustado aos dados da curva de calibração do Cr(VI) em meio ASTM

sem vitaminas e as concentrações reais de dicromato de potássio determinadas a partir das concentrações reais de Cr(VI) apresentam-se na Tabela 3. O desvio médio das concentrações reais de dicromato de potássio em relação às nominais variou entre 3,2 e 6,7%. Após 48 h de exposição, o decaimento de Cr(VI) calculado foi sempre igual a 0% (Tabela 3).

**Tabela 3.** Concentrações nominais e reais de dicromato de potássio e de Cr(VI) nas soluções de teste e o decaimento do Cr(VI) no meio de teste do bioensaio agudo com o dicromato de potássio e *Daphnia magna*. As concentrações reais de Cr(VI) foram calculadas a partir das leituras individuais da absorvância, usando o modelo de regressão linear: concentração de Cr(VI) (mg/l) = 0,079 + 11,164 x absorvância (unidades de densidade ótica). As concentrações reais de dicromato de potássio foram calculadas a partir das concentrações reais de Cr(VI). O desvio médio (das concentrações reais de dicromato de potássio em relação às nominais) =  $|100 - (\text{concentração real} \times 100 / \text{concentração nominal})|$ , expresso em percentagem. O decaimento (decaimento do Cr(VI) no meio de teste durante o período de exposição) =  $(\text{média da absorvância às 0 h} - \text{média da absorvância às 48 h}) \times 100 / \text{média da absorvância às 0 h}$ , expresso em percentagem. Os resultados são a média  $\pm$  desvio padrão (n = 4). Conc. – concentração. Abs. – absorvância. D.O. – densidade ótica. 0 h – início do bioensaio. 48 h – fim do bioensaio.

Conc. nominais dicromato de potássio (mg/l)	Conc. nominais Cr(VI) (mg/l)	Abs. (unidades D.O.) às 0 h	Conc. reais de Cr(VI) (mg/l)	Conc. reais dicromato de potássio (mg/l)	Desvio médio (%)	Abs. (unidades de D.O.) às 48 h	Decaimento (%)
0,7	0,25	0,016 ( $\pm 0,000$ )	0,261 ( $\pm 0,000$ )	0,75 ( $\pm 0,00$ )	6,7	0,024 ( $\pm 0,002$ )	0
0,84	0,3	0,020 ( $\pm 0,000$ )	0,306 ( $\pm 0,000$ )	0,87 ( $\pm 0,00$ )	4,1	0,025 ( $\pm 0,002$ )	0
1,0	0,35	0,025 ( $\pm 0,000$ )	0,362 ( $\pm 0,000$ )	1,03 ( $\pm 0,00$ )	3,4	0,031 ( $\pm 0,000$ )	0
1,21	0,43	0,032 ( $\pm 0,000$ )	0,437 ( $\pm 0,006$ )	1,25 ( $\pm 0,02$ )	3,2	0,038 ( $\pm 0,001$ )	0
1,45	0,51	0,041 ( $\pm 0,001$ )	0,535 ( $\pm 0,011$ )	1,53 ( $\pm 0,03$ )	5,4	0,047 ( $\pm 0,001$ )	0
1,74	0,62	0,050 ( $\pm 0,001$ )	0,633 ( $\pm 0,006$ )	1,81 ( $\pm 0,02$ )	3,9	0,056 ( $\pm 0,001$ )	0
2,08	0,74	0,060 ( $\pm 0,000$ )	0,753 ( $\pm 0,000$ )	2,15 ( $\pm 0,00$ )	3,4	0,062 ( $\pm 0,001$ )	0
2,5	0,88	0,075 ( $\pm 0,000$ )	0,912 ( $\pm 0,006$ )	2,60 ( $\pm 0,02$ )	4,2	0,080 ( $\pm 0,001$ )	0
3,0	1,06	0,091 ( $\pm 0,000$ )	1,090 ( $\pm 0,006$ )	3,12 ( $\pm 0,02$ )	3,8	0,096 ( $\pm 0,001$ )	0

As percentagens de mortalidade cumulativa obtidas às 24 e 48 h por tratamento no bioensaio em que se testaram os efeitos agudos do dicromato de potássio em juvenis de *D. magna* apresentam-se na Figura 5. O modelo de regressão ajustado aos dados da curva de toxicidade do dicromato de potássio às 24 h (transformação probit das percentagens de mortalidade *versus* o logaritmo das correspondentes concentrações de dicromato de potássio) foi: mortalidade cumulativa (unidades probit) = 0,996 + 5,356 x logaritmo da concentração de dicromato de potássio (mg/l)). A CL<sub>50</sub> e o respetivo intervalo de confiança a 95% (indicado entre parêntesis), às 24 h, calculados a partir do modelo foram: 0,652 mg/l (0,413 – 0,777). Após 48 h de exposição, todas as concentrações de dicromato de potássio testadas provocaram 90 - 100% de mortalidade, o que inviabilizou a transformação probit das percentagens de mortalidade e consequentemente a determinação da CL<sub>50</sub> às 48 h.

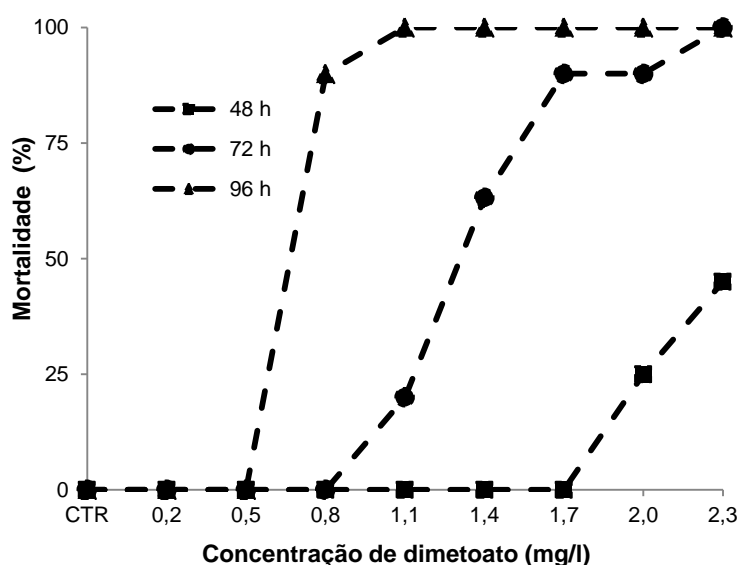


**Figura 5.** Percentagens de mortalidade cumulativa de *Daphnia magna* obtidas às 24 e 48 h nos tratamentos do bioensaio agudo com o dicromato de potássio CTR – controlo.

### 3.4. Toxicidade aguda de dimetoato para juvenis *D. magna*

As percentagens de mortalidade cumulativa obtidas às 48, 72 e 96 h por tratamento no bioensaio em que se testaram os efeitos agudos do dimetoato em juvenis de *D. magna* apresentam-se na Figura 6. Às 24 h, não ocorreu mortalidade dos animais em nenhum dos tratamentos testados. O modelo de regressão ajustado aos dados da curva de toxicidade do dimetoato às 72 h (transformação probit das percentagens de mortalidade *versus* o logaritmo das correspondentes concentrações de dimetoato) foi:

mortalidade cumulativa (unidades Probit) =  $-1,243 + 9,884 \times \log(\text{concentração de dimetoato (mg/l)})$ . A  $CL_{50}$  e o respetivo intervalo de confiança a 95% (indicado entre parêntesis), às 72 h, calculados a partir do modelo foram: 1,332 (1,237 – 1,420) mg/l. Após 48 h de exposição, a mortalidade observada foi inferior a 50% e após 96 h de exposição, variou entre 90 e 100%, o que inviabilizou a transformação probit das percentagens de mortalidade e consequentemente a determinação da  $CL_{50}$  a estes períodos de exposição.



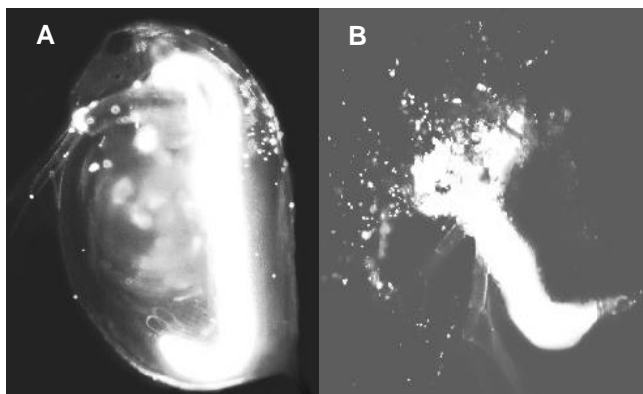
**Figura 6.** Percentagens de mortalidade cumulativa de *Daphnia magna* obtidas às 48, 72 e 96 h nos tratamentos do bioensaio agudo com o dimetoato. CTR – controlo.

### 3.5. Efeitos agudos de microplásticos em juvenis de *D. magna*

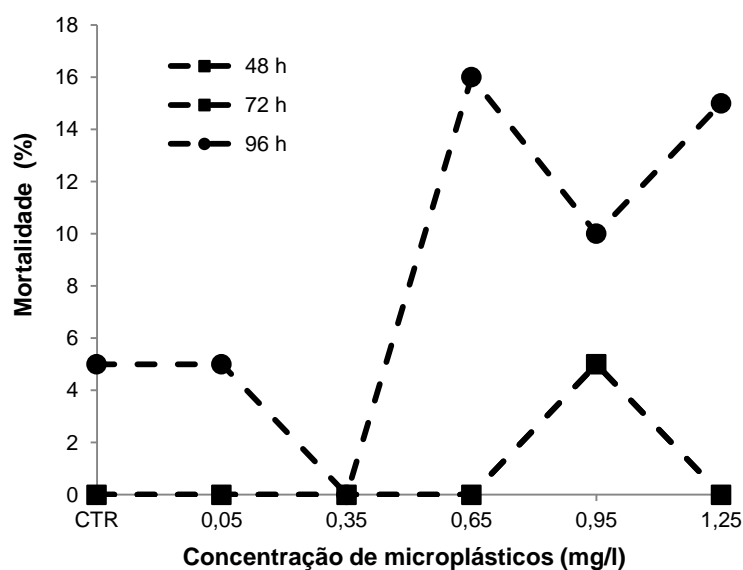
Após 24 h e ao longo de todo o ensaio, em todos os tratamentos contendo microplásticos, o trato gastrointestinal dos animais apresentava uma coloração rosada, sendo as partículas visíveis no seu interior na Figura 6.A com uma cor branca.

As percentagens de mortalidade cumulativa obtidas às 48, 72 e 96 h por tratamento no bioensaio em que se testaram os efeitos agudos dos microplásticos em juvenis de *D. magna* apresentam-se na Figura 7. Às 24 h, não ocorreu mortalidade dos animais em nenhum dos tratamentos testados. A mortalidade das dáfias não foi dependente da concentração, ou seja, não aumentou com o aumento da concentração de

microplásticos e na sua generalidade foi inferior a 50%, por estas razões, não foi possível determinar os valores da CL<sub>50</sub> para nenhum período de exposição.



**Figura 7.** Indivíduos de *Daphnia magna* após 96 h de exposição a 1,25 mg/l (A) e 0,95 mg/l (B) de microplásticos.



**Figura 8.** Percentagens de mortalidade cumulativa de *Daphnia magna* obtidas às 48, 72 e 96 h nos tratamentos do bioensaio agudo com os microplásticos. CTR – controlo.

Os dados da mortalidade não cumulativa estão apresentados na Tabela 4. Até 72 h de exposição, a mortalidade observada variou entre 0 e 5%. Após 96 h de exposição, foi observado que 15% das dáfias estavam imóveis nas concentrações de 0,65 e 1,25 mg/l de microplásticos, contudo, o teste de Kruskal-Wallis mostrou que, a mortalidade

não foi significativamente diferente entre os vários tratamentos a este período de exposição ( $H_c = 7,476$ ;  $\chi^2_{0,05, 5} = 11,070$ ;  $p > 0,05$ ). As percentagens de mortalidade não cumulativa de cada tratamento foram comparadas individualmente a diferentes períodos de exposição (24, 48, 72 e 96 h) (Tabela 5). O teste de Kruskal-Wallis mostrou diferenças significativas para as concentrações de 0,65 e 1,25 mg/l (Tabela 5), contudo, o teste de Nemenyi não mostrou diferenças significativas entre os diferentes períodos de exposição para estas duas concentrações (para ambas as concentrações:  $q = 2,52$ ;  $q_{0,05,4} = 2,64$ ;  $p > 0,05$ ).

**Tabela 4.** Percentagens de mortalidade não cumulativa de *Daphnia magna* obtidas às 24, 48, 72 e 96 h nos tratamentos do bioensaio agudo com os microplásticos. Os dados são a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 4$ ). E.P.M – erro padrão da média. CTR – controlo.

Concentração microplásticos (mg/l)	Média da mortalidade (%) $\pm$ E.P.M.			
	24 h	48 h	72 h	96 h
CTR	0	0	0	5 $\pm$ 5
0,05	0	0	0	5 $\pm$ 5
0,35	0	0	0	0
0,65	0	0	0	15 $\pm$ 6
0,95	0	5 $\pm$ 5	0	5 $\pm$ 5
1,25	0	0	0	15 $\pm$ 5

**Tabela 5.** Resultados do teste de Kruskal-Wallis para comparar entre diferentes períodos de exposição (24, 48, 72 e 96 h) a percentagem de mortalidade não cumulativa obtida em cada tratamento do bioensaio agudo com os microplásticos e *Daphnia magna*. Para cada tratamento,  $n = 4$ . O nível de significância foi de 0.05. CTR = controlo.

Concentração microplásticos (mg/l)	Teste de Kruskal-Wallis		
	$H_c$	$\chi^2_{0,05, 3}$	p
CTR	3,000	7,815	> 0,05
0,05	3,000		> 0,05
0,35	0,000		> 0,05
0,65	10,286		< 0,05
0,95	2,143		> 0,05
1,25	10,385		< 0,05

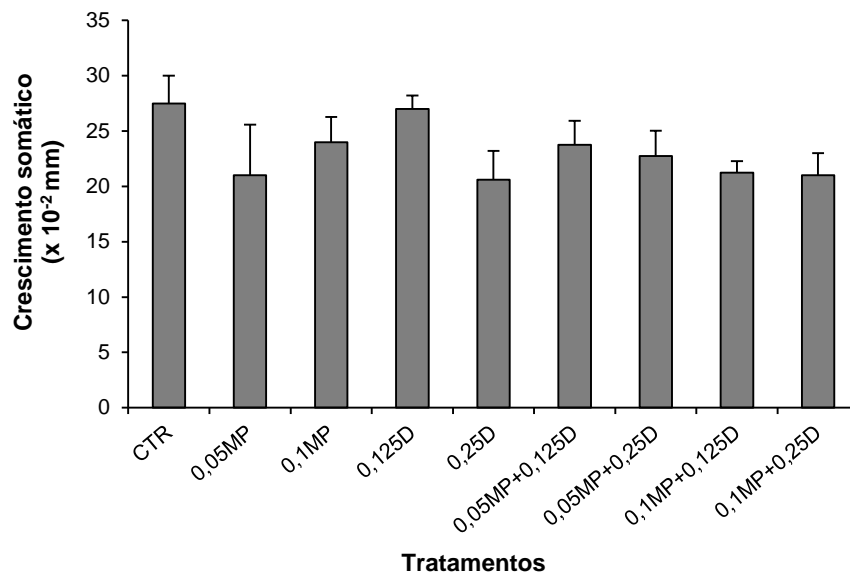
Na Figura 7.B é possível observar a destruição do trato gastrointestinal de um indivíduo de *D. magna* após 96 h de exposição a 0,95 mg/l de microplásticos.

### **3.6. Efeitos crónicos de microplásticos e de dimetoato, isoladamente e em misturas, em *D. magna***

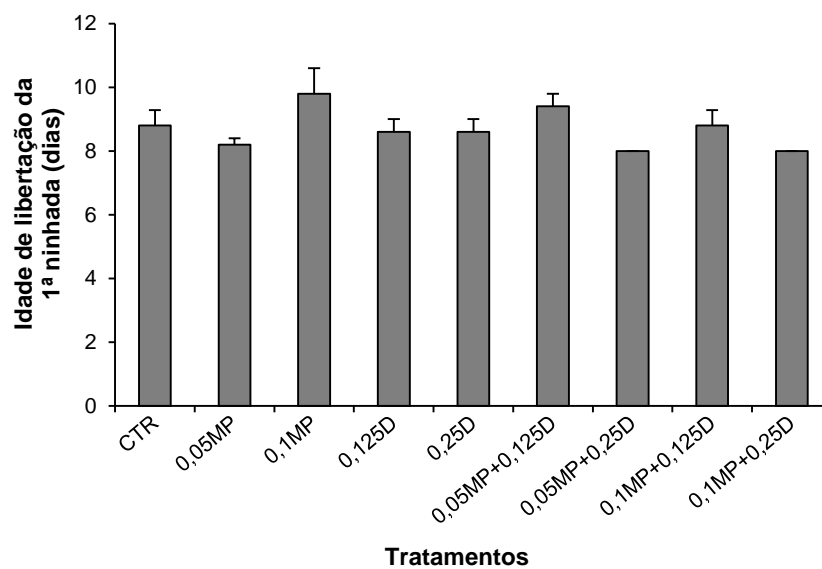
Durante o ensaio ocorreu a morte de uma progenitora na mistura contendo 0,1 mg/l de microplásticos e 0,25 mg/l de dimetoato, não tendo ocorrido mortalidade das progenitoras em nenhum outro tratamento. Os efeitos dos microplásticos e do dimetoato, isoladamente e em misturas, no crescimento somático e na reprodução de *D. magna* estão apresentados na Figura 9 e os resultados da análise dos dados usando a 2-ANOVA com interação apresentam-se na Tabela 6. Em relação ao crescimento somático (Figura 9.A) não foram encontradas diferenças significativas entre tratamentos contendo microplásticos e tratamentos que não continham estas partículas, nem entre tratamentos com e sem dimetoato, e a interação entre os dois fatores (i.e. microplásticos e dimetoato) também não foi significativa (Tabela 6). Resultados semelhantes (Tabela 6) foram obtidos para a média do número total de juvenis produzidos por fêmea (Figura 9.C) e para a média do número total de juvenis móveis produzidos por fêmea (Figura 9.C). Em relação à idade de libertação da primeira ninhada (Figura 9.B) não se verificaram diferenças significativas entre tratamentos ( $H_c = 15,127$ ;  $\chi^2_{0,05,8} = 15,507$ ;  $p > 0,05$ ). No entanto, relativamente à média do número de ovos abortados produzidos por fêmea (Figura 9.D), obtiveram-se diferenças significativas entre tratamentos ( $H_c = 21,446$ ;  $\chi^2_{0,05,8} = 15,507$ ;  $p < 0,05$ ) e o teste de Dunn indicou diferenças significativas entre o tratamento contendo 0,05 mg/l de microplásticos e os restantes tratamentos ( $Q = 3,30$ ;  $Q_{0,05,9} = 3,20$ ,  $p < 0,05$ ), sendo que a referida concentração de microplásticos testada isoladamente provocou um aumento significativo do número de ovos abortados (Figura 9.D). No entanto, o tratamento contendo a concentração mais elevada de microplásticos testada não induziu efeitos significativamente diferentes do grupo controlo.



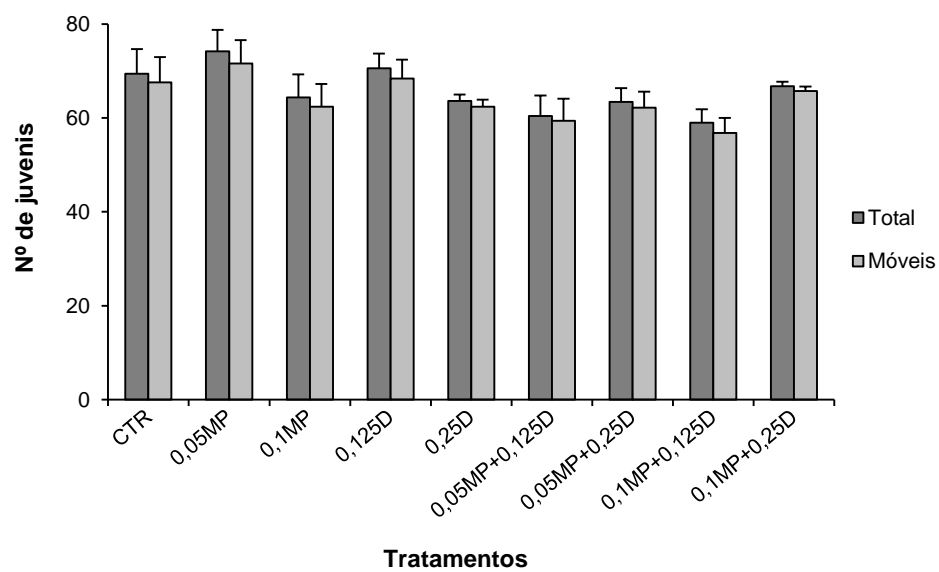
(A)



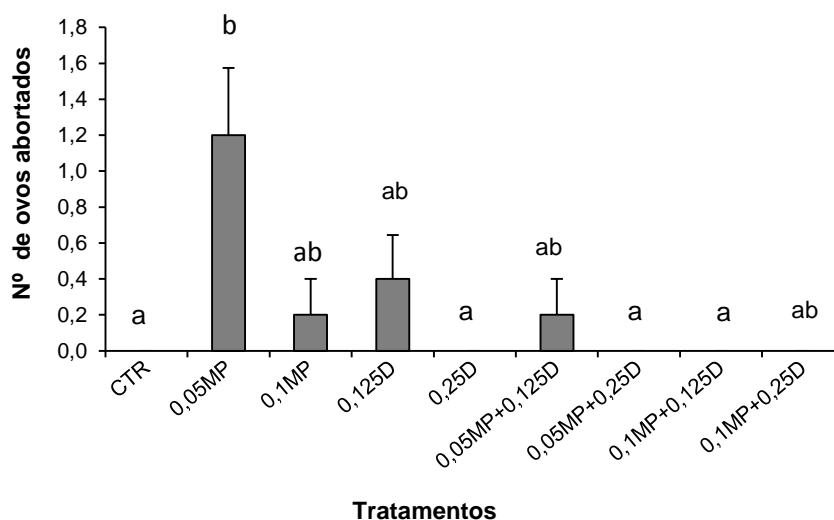
(B)



(C)



(D)



**Figura 9.** Efeitos crônicos de microplásticos e de dimetoato, isoladamente e em misturas, em *Daphnia magna*. A – média do crescimento somático; B – média da idade de libertação da primeira ninhada; C – média do número total de juvenis produzidos por fêmea; C – média do número de juvenis móveis produzidos por fêmea e D – média do número de ovos abortados produzidos por fêmea. Os resultados são a média das progenitoras que sobreviveram até ao fim dos 21 dias de exposição com as correspondentes barras de erro padrão da média. Para cada tratamento,  $n = 5$ , à exceção do tratamento 0,1MP+0,25D, cujo  $n = 4$ . CTR – controlo. 0,05MP - 0,05 mg/l de microplásticos. 0,1MP - 0,1 mg/l de microplásticos. 0,125D - 0,125 mg/l de dimetoato. 0,25D - 0,25 mg/l de dimetoato. 0,05MP+0,125D - 0,05 mg/l de microplásticos e 0,125 mg/l de dimetoato. 0,05MP+0,25D - 0,05 mg/l de microplásticos e 0,25 mg/l de dimetoato. 0,1MP+0,125D - 0,1 mg/l de microplásticos e 0,125 mg/l de dimetoato. 0,1MP+0,25D - 0,1 mg/l de microplásticos e 0,25 mg/l de dimetoato. Letras diferentes em cima das barras significam diferenças estatísticas significativas (teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn;  $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 6.** Resultados da análise de variância com dois fatores (2-ANOVA) para investigar os efeitos de microplásticos e de dimetoato e potencial interação entre os dois fatores, após 21 dias de exposição, no crescimento somático (N = 36), número total de juvenis (N = 44) e número de juvenis móveis (N = 44) de *Daphnia magna*. n – número de fêmeas progenitoras. D.P. – desvio padrão. MP – microplásticos. D – dimetoato. MP x D – interação. MP – microplásticos. D – dimetoato. 0,05 – 0,05 mg/l. 0,1 – 0,1 mg/l. 0,125 – 0,125 mg/l. 0,25 – 0,25 mg/l.

Parâmetro	Fator	Nível	n	Média ± D.P.	F	P
<b>Crescimento somático</b> (x 10 <sup>-2</sup> mm)	MP	0	13	24,7 ± 5,5	1,379	0,269
		0,05	11	22,6 ± 5,1		
		0,1	12	22,3 ± 3,8		
	D	0	12	24,4 ± 5,9	1,181	0,322
		0,125	12	24,0 ± 3,7		
		0,25	12	21,4 ± 4,6		
	MP x D				1,091	0,381
<b>Nº total de juvenis</b>	MP	0	15	67,9 ± 8,1	1,062	0,357
		0,05	15	66,0 ± 10,3		
		0,1	14	63,1 ± 7,8		
	DT	0	15	69,3 ± 10,9	2,181	0,128
		0,125	15	63,3 ± 9,1		
		0,25	14	64,4 ± 4,4		
	MP x D				1,828	0,145
<b>Nº de juvenis móveis</b>	MP	0	15	66,1 ± 8,6	0,897	0,417
		0,05	15	64,4 ± 10,6		
		0,1	14	61,4 ± 8,2		
	D	0	15	67,2 ± 11,1	1,598	0,217
		0,125	15	61,5 ± 9,7		
		0,25	14	63,3 ± 5,0		
	MP x D				1,370	0,264

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Padronização dos métodos analíticos para determinação das concentrações reais de dicromato de potássio e microplásticos no meio de teste dos bioensaios

Os espectros de absorção obtidos para as soluções de Cr(VI) (7,1 mg/l) preparadas em meio ASTM sem vitaminas e em água u.p. com pH básico, e os picos de absorção correspondentes, estão em boa concordância com os resultados de Sena *et al.*, (2000). Segundo estes autores, o ião cromato ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) é a espécie de Cr(VI) predominante em soluções aquosas com  $\text{pH} > 7$  e tem dois picos de absorção, um a 270 nm e outro (maior) a 375 nm. No presente estudo, o meio ASTM tem um  $\text{pH} \approx 8,4$  unidades e os picos característicos do ião  $\text{CrO}_4^{2-}$  estão evidentes nos espectros obtidos, a 272 nm e outro (maior) a 372 nm. Conclui-se, desta forma, que o ião  $\text{CrO}_4^{2-}$  é a espécie de Cr(VI) predominante no meio de teste. A adequabilidade do método proposto por Sena *et al.* (2000) para as condições experimentais do presente estudo foi avaliada através do estudo dos parâmetros analíticos linearidade, especificidade, limite de detecção e limite de quantificação. Tanto no meio ASTM sem vitaminas como em água u.p. com pH básico, o método apresentou uma resposta linear em todo o intervalo estudado (0,18 - 1,41 mg/l de Cr(VI)), com coeficientes de determinação elevados. Os modelos de regressão linear em meio ASTM sem vitaminas e em água u.p. com pH básico não foram estatisticamente diferentes indicando que os componentes do meio ASTM não interferem com a medição da absorvância do Cr(VI) a 372 nm. Efetivamente, a ausência dos picos de absorção característicos do Cr(VI) (ou da espécie  $\text{CrO}_4^{2-}$ ) no espectro do meio ASTM sem vitaminas confirma que os componentes do meio ASTM não absorvem a radiação UV nestes comprimentos de onda. O método foi considerado, desta forma, específico para o Cr(VI) nas condições experimentais usadas. Os limites de detecção e de quantificação obtidos foram inferiores às concentrações de Cr(VI) testadas no bioensaio agudo (nomeadamente 0,25 - 0,88 mg/l) e, por conseguinte, foi possível detetar e quantificar as concentrações reais de Cr(VI) no meio de teste. Em suma, a técnica de espectrofotometria UV-vis foi considerada adequada para determinar as concentrações reais de Cr(VI), e consequentemente de dicromato de potássio, nas condições experimentais do presente estudo.

As concentrações de microplásticos utilizados neste estudo são passíveis de serem determinadas por espectrofluorimetria, de acordo com as indicações do fornecedor das partículas e trabalhos anteriormente publicados (Ferreira *et al.*, 2015; Fonte *et al.*

2016; Luís *et al.*, 2015). De forma a validar o método nas condições experimentais do presente estudo, os parâmetros analíticos linearidade, especificidade, limite de deteção e limite de quantificação foram estudados. Tanto no meio ASTM sem vitaminas como em água u.p. com pH básico, o método apresentou uma resposta linear em todo o intervalo estudado (0,03 – 1,43 mg/l de microplásticos) com coeficientes de determinação elevados. Os modelos de regressão linear em meio ASTM sem vitaminas e em água u.p. não foram estatisticamente diferentes indicando que os componentes do meio ASTM não interferem com a leitura da fluorescência dos microplásticos. O método foi considerado, desta forma, específico para os microplásticos nas condições experimentais usadas. Contudo, os limites de deteção e quantificação determinados foram superiores às concentrações de microplásticos testadas no ensaio agudo e crónico (0,05 – 1,25 mg/l) e, por isso, o método não foi considerado adequado para determinar as concentrações de exposição dos microplásticos no meio de teste.

#### **4.2. Validação dos bioensaios**

A variação dos fatores abióticos pH e concentração de oxigénio dissolvido no meio de teste, a mortalidade observada nos vários grupos controlo e a média do número de descendentes móveis reportada no grupo controlo do bioensaio crónico preenche os critérios de validade das normas da OCDE para os ensaios agudo e crónico com *D. magna* (OECD, 2004; OECD, 2012). A variação da temperatura no ensaio agudo com o dicromato de potássio foi superior ao recomendado pela OCDE porém, uma vez que não se trata de um critério de validade, não invalidou o ensaio.

#### **4.3. Toxicidade aguda do dicromato de potássio para juvenis de *D. magna***

O desvio das concentrações reais de dicromato de potássio em relação às nominais foi sempre inferior a 20%, pelo que segundo as recomendações da norma da OCDE para ensaios agudos com *D. magna*, as concentrações de exposição podem ser indicadas como as nominais (OECD, 2004). Ao fim das 48 h de exposição, não ocorreu decaimento do Cr(VI) no meio de teste e por isso pode-se assumir que as concentrações de Cr(VI), e consequentemente de dicromato de potássio, foram mantidas estáveis durante o ensaio.

A CL<sub>50</sub> do dicromato de potássio calculada no presente estudo com base nos resultados obtidos às 24 h de (0,652 mg/l) encontra-se entre os valores de 0,6 e 2,1 mg/l indicados como indicativos de sensibilidade adequada dos organismos para a realização de testes de toxicidade com *D. magna* (OECD, 2004), pelo que as culturas parentais testadas foram consideradas fontes adequadas de organismos para os bioensaios a realizar de seguida.

#### **4.4. Toxicidade aguda de dimetoato para juvenis de *D. magna***

A CL<sub>50</sub> do dimetoato determinada no presente estudo às 72 h (1,332 mg/l) encontra-se no intervalo de valores reportados na literatura após 48 h de exposição. Por exemplo, Beusen e Neven (1989) referem uma CE<sub>50</sub> às 48 h de 1,5 mg/l e Andersen *et al.*, (2006) indicam uma CE<sub>50</sub> às 48 h de 1,1 mg/l, pelo que o dimetoato foi menos tóxico para *D. magna* no presente trabalho. A diferença de toxicidade do dimetoato entre este estudo e os trabalhos anteriormente mencionados pode dever-se à utilização de clones de *D. magna* com sensibilidades diferentes e/ou à utilização de condições de cultura dos organismos parentais distintas (Baird *et al.*, 1989a; Baird *et al.*, 1990).

Tendo em consideração que no presente estudo após 96 h de exposição não ocorreu mortalidade nas concentrações de 0,2 e 0,5 mg/l (Figura 6) e os valores da CE<sub>50</sub> na mobilidade das progenitoras (0,11 e 0,19 mg/l) reportados por Beusen e Neven (1989) bem como os valores das Concentrações de Efeito Não Observado (CENO<sup>1</sup>; 0,060 e 0,095 mg/l) e de Efeito Observado (CEO<sup>1</sup>; 0,124 e 0,170 mg/l) no número total de juvenis produzidos por fêmea reportados por estes autores, após 23 dias de exposição ao dimetoato, foram escolhidas as concentrações de 0,125 e 0,25 mg/l para serem testadas no ensaio crónico para avaliar os efeitos do dimetoato no crescimento e reprodução de *D. magna*.

#### **4.5. Efeitos agudos de microplásticos em juvenis de *D. magna***

À semelhança de estudos anteriores com microplásticos e *D. magna* (Rehse *et al.*, 2016; Rist *et al.*, 2017; Rosenkranz *et al.*, 2009), a presença de partículas no trato

---

<sup>1</sup> CENO – Concentração testada mais elevada que não causou efeitos significativos em relação ao controlo; CEO – Concentração testada mais baixa que causou efeitos significativos em relação ao controlo

gastrointestinal dos organismos aqui observada demonstra que *D. magna* ingeriu os microplásticos testados (1 – 5 µm de diâmetro). Assim, quando presentes no meio natural, microplásticos com as características das partículas aqui testadas são propensos a serem ingeridos por este organismo filtrador.

Em concordância com o estudo de Rehse *et al.* (2016), onde foram avaliados os efeitos agudos de microesferas de polietileno em *D. magna* (0,96 g/cm<sup>3</sup>; 1 – 4 µm de diâmetro; 12,5 – 200 mg/l), a mortalidade (cumulativa e não cumulativa) aqui observada não foi superior a 10% dentro do período de exposição recomendado pela OCDE (OECD, 2004). Apenas após 96 h de exposição foi observado uma mortalidade superior a 10%, a qual, mesmo não tendo sido significativamente diferente em relação a outros períodos de exposição, evidencia a sugestão dada por Rehse *et al.* (2016) e Karami (2017) de que é necessário fazer adaptações aos procedimentos de teste padronizados para estudar os impactos dos microplásticos nos organismos. De notar que, a mortalidade (cumulativa e não cumulativa) observada nos tratamentos com 0,65 e 1,25 mg/l de microplásticos após 96 h de exposição não pode ser exclusivamente explicada pela falta de alimento durante o ensaio, pois a percentagem de dáfnias imóveis observada no grupo controlo a este período de exposição foi inferior a 10%. É possível, contudo, que a ausência de alimento durante um período mais longo tenha tornado as dáfnias mais vulneráveis aos microplásticos.

As concentrações de microplásticos mais elevadas encontradas até aos dias de hoje na coluna de água corresponderam a aproximadamente 9 partículas/l (Desforges *et al.*, 2014), 13 partículas/l (Moore *et al.*, 2011) e, excecionalmente num local próximo a uma instalação industrial de polietileno, a 103 partículas/l (Nóren, 2007). Os resultados aqui obtidos indicam que concentrações bastante superiores a estas não causam efeitos letais nas dáfnias, uma vez que a gama de concentrações aqui testada de 0,05 a 1,25 mg/l (Apêndice A) não causou efeitos tóxicos agudos. De facto, os resultados de Rehse *et al.* (2016) mostraram que são necessárias concentrações de microesferas de polietileno (1 – 4 µm de diâmetro) iguais ou superiores a 25 mg/l ( $2,5 \times 10^{10}$  -  $3,9 \times 10^8$  partículas/l), após 96 h de exposição, para causarem efeitos significativos na mobilidade de *D. magna* em relação ao grupo controlo, tendo estes autores obtido um valor da CE<sub>50</sub> às 96 h de 57,43 mg/l.

Como sugerido pela Figura 7.B, as percentagens de mortalidade observadas ao longo do ensaio, e principalmente após 96 h de exposição, podem ter sido causadas pela aderência dos microplásticos ao exosqueleto das dáfnias (Figura 7.A), bloqueando os seus movimentos e tornando-as imóveis, ou podem ter sido devidas ao facto de alguns

animais terem sido menos capazes de excretar os microplásticos através das fezes, levando à obstrução do trato gastrointestinal e consequentemente à sua morte (Figura 7.B). De facto, em estudos com larvas de *D. labrax* (Mazurais *et al.*, 2015) e poliquetas *A. marina* (Besseling *et al.*, 2012), a obstrução do trato gastrointestinal pelos microplásticos foi indicada como a causa da morte observada.

#### **4.6. Efeitos crónicos de microplásticos e dimetoato, isoladamente e em misturas, em *D. magna***

Nos tratamentos contendo apenas o dimetoato, as concentrações testadas (0,125 e 0,250 mg/l) não causaram a morte das progenitoras nem provocaram efeitos significativos no crescimento e reprodução das dáfnias. Uma vez que estas concentrações são superiores aos valores de CEO (0,124 e 0,170 mg/l) reportados por Beusen e Neven (1989) na média do número total de juvenis produzidos por fêmea, é concluído que o dimetoato foi menos tóxico para *D. magna* no presente estudo em relação ao estudo de Beusen e Neven (1989). Esta diferença de toxicidade pode ter sido devida (como discutido anteriormente) à utilização de clones de *D. magna* com sensibilidades diferentes e/ou à utilização de condições de cultura distintas (Baird *et al.*, 1989a; Baird *et al.*, 1990).

Em relação aos tratamentos contendo apenas microplásticos, os resultados obtidos no crescimento, na idade de libertação da primeira ninhada e no número total de juvenis estão em boa concordância com os resultados de Rist *et al.* (2017) e Ogonowski *et al.* (2016). Efetivamente, Rist *et al.* (2017) não observaram efeitos significativos no sucesso reprodutivo nem no crescimento de *D. magna* após 21 dias de exposição a concentrações até  $1,4 \times 10^8$  /l de microesferas de poliestireno (2 µm de diâmetro). No estudo de Ogonowski *et al.* (2016), onde foram usados microplásticos iguais aos do presente estudo (1 – 5 µm de diâmetro), também não foram observados efeitos negativos no sucesso reprodutivo após 21 dias de exposição a concentrações até  $10^8$  microesferas/l. Em relação ao crescimento, Ogonowski *et al.* (2016) observaram efeitos significativos nas concentrações de microplásticos testadas comparativamente ao controlo, contudo, foi usada uma concentração de alimento dez vezes menor à recomendada pela norma 211 da OCDE e, por conseguinte, a aqui usada (OECD, 2012). Uma vez que no trabalho de Ogonowski *et al.*, (2016) o nível de alimento foi inferior ao valor ótimo, os animais estavam provavelmente mais vulneráveis aos microplásticos. Os resultados aqui obtidos juntamente com os resultados de Rist *et al.* (2017) e Ogonowski



*et al.* (2016) indicam que o sucesso reprodutivo e o crescimento de *D. magna* são resistentes à presença de microplásticos, em concentrações superiores às reportadas no meio ambiente.

No presente trabalho, em contraste aos trabalhos de Rist *et al.* (2017) e Ogonowski *et al.* (2016), foram estudados os efeitos dos microplásticos no número de ovos abortados de *D. magna*. Após 21 de exposição, foi observado que o tratamento com 0,05 mg/l de microplásticos aumentou significativamente o número de ovos abortados em relação ao controle. Os ovos abortados foram observados no meio de teste e, por isso, pode-se concluir que os efeitos dos microplásticos ocorreram após a postura dos ovos na câmara incubadora. No entanto, os microplásticos também podem ter diminuído a quantidade de nutrientes disponível para progenitoras e, durante o processo de ovogênese, os ovos podem ter ficado menos nutridos, tornando-se, mais tarde, inviáveis. Neste sentido, podem ser levantadas três hipóteses para explicar a liberação dos ovos abortados induzida pelos microplásticos: (i) os microplásticos reduziram a quantidade de alimento ingerida pelas dáfrias; (ii) ocorreu liberação de substâncias tóxicas dos microplásticos para o meio de teste ou dentro dos organismos e (iii) os microplásticos aderiram a estruturas externas das dáfrias. Em relação à primeira hipótese, vários trabalhos têm reportado que os microplásticos diminuem as taxas de alimentação dos organismos (e.g. Cole *et al.*, 2013; Wright *et al.*, 2013). Em *D. magna*, Rist *et al.* (2017) não observaram efeitos significativos nas taxas de alimentação deste organismo após exposição durante 2 h a  $1,4 \times 10^8$  microesferas de poliestireno/l (2  $\mu$ m de diâmetro). Contudo, no estudo de Ogonowski *et al.* (2016), onde foram usados microplásticos iguais ao do presente estudo, foi observado uma diminuição significativa das taxas de alimentação de *D. magna* após exposição durante 72 h a  $2,25 \times 10^8$  micropartículas/l. No presente estudo, os microplásticos, tal como no trabalho de Ogonowski *et al.* (2016), podem ter reduzido a quantidade de alimento ingerida pelas dáfrias e, como consequência, menos nutrientes estavam disponíveis para a formação dos ovos no ovário, traduzindo-se em ovos menos nutridos e mais tarde inviáveis. Relativamente à segunda hipótese, alguns estudos têm sugerido que os efeitos observados, tais como uma correlação positiva entre o número de microplásticos ingeridos e expressão do gene citocromo-P450-1A1, efeitos em biomarcadores bioquímicos e efeitos hepatotóxicos, devem-se à liberação de substâncias químicas incorporadas nos microplásticos para a água ou dentro dos organismos (Karami *et al.*, 2016; Mazurais *et al.*, 2015). No presente estudo, estas substâncias químicas podem ter: i) reduzido a quantidade de alimento ingerida pelas dáfrias e por isso menos nutrientes estavam disponíveis para a formação dos ovos no ovário, tornando-os menos nutridos e mais tarde inviáveis (Barata e Baird,

2000) e (ii) exercido efeitos tóxicos diretamente nos ovos, uma vez que câmara incubadora está diretamente ligada ao meio externo e é mantido pelas progenitoras um fluxo de água através desta para fornecer oxigénio aos embriões (Rosenkranz *et al.*, 2009). A folha de dados de segurança dos microplásticos usados indica que estes contêm <0,1% de formaldeído. Um estudo com *D. magna* e formaldeído reportou que a exposição crónica a 1,09 mg/l de formaldeído causa a morte e decomposição dos ovos e embriões enquanto presentes na câmara incubadora das progenitoras (Ton *et al.*, 2012). Uma vez que 0,1% de 0,05 mg/l corresponde a  $5 \times 10^{-4}$  mg/l de formaldeído, parece pouco provável que mesmo que tenha ocorrido lixiviação de formaldeído dos microplásticos para o meio de teste, este composto tenha causado efeitos tóxicos. Contudo, para além do formaldeído, o plástico testado pode conter outros compostos não carcinogénicos e que, por isso, não estão indicados na folha de dados de segurança, tais como antioxidantes, estabilizadores contra o calor e a luz, etc., e que podem ter causado o aumento do número de ovos abortados observado (Vasile e Pascu, 2005). Assim, será importante em estudos futuros analisar a composição dos microplásticos testados e avaliar a toxicidade dos seus componentes, conforme sugerido por outros autores (Jemec *et al.*, 2017; Karami *et al.*, 2016; Karami 2017). Relativamente à última hipótese colocada, aquando da observação das dáfnias ao microscópico após o bioensaio agudo, foram visualizados agregados de microplásticos aderidos à carapaça, membros torácicos e antenas secundárias das dáfnias (Figura 7). No ensaio crónico, a possível aderência dos microplásticos a estas estruturas pode significar que os microplásticos “ocuparam” o espaço destinado às algas e/ou bloquearam os movimentos dos apêndices, levando destas duas formas a uma redução das taxas de alimentação e, conseqüentemente, a ovos menos nutridos. Por outro lado, a possível aderência dos microplásticos aos membros torácicos e antenas das dáfnias pode ter estimulado os movimentos de limpeza efetuados pelas garras pós-abdominais. Num estudo com cianobactérias filamentosas/coloniais e não tóxicas, os autores reportaram que o aumento do número de ovos abortados observado estava associado com os movimentos de limpeza efetuados pelas garras pós-abdominais (Bednarska e Slusarczyk, 2013). Durante estes movimentos, o abdómen dos organismos move-se para cima e depois para fora e as garras pós-abdominais removem do aparelho de alimentação quaisquer partículas interferentes (Bednarska e Slusarczyk, 2013). Durante esses movimentos, o processo abdominal, o qual normalmente fecha a parte inferior da câmara incubadora, também se move para cima (Bednarska e Slusarczyk, 2013). Como resultado, no presente estudo, os ovos podem ter caído da câmara incubadora “aberta” e/ou à medida que o abdómen se deslocava para trás, o processo abdominal pode ter danificado a membrana dos ovos, causando a sua desintegração e tornando-os inviáveis. Para além disso, durante este

processo, todas as partículas, incluindo as edíveis, são descartadas e, como consequência, a captação de alimento pode ter sido reduzida, traduzindo-se em ovos menos nutridos. O fenómeno de aderência dos microplásticos a estruturas externas dos organismos foi observado em copépodes marinhos expostos a microesferas de poliestireno ( $1 \times 10^6/\text{ml} - 10 \times 10^3/\text{ml}$ ;  $0,4 - 3,8 \mu\text{m}$ ) (Cole *et al.*, 2013). Em *D. magna*, Rehse *et al.* (2016) não observaram a aderência de microesferas de polietileno ( $0,96 \text{ g/cm}^3$ ;  $1 - 4 \mu\text{m}$  de diâmetro;  $12,5 - 200 \text{ mg/l}$ ) ao exosqueleto dos animais. Os resultados deste trabalho juntamente com os de Cole *et al.* (2013) e Rehse *et al.* (2016) mostram que a aderência dos microplásticos ao exosqueleto dos organismos, nomeadamente das dáfrias, pode, por exemplo, depender do tipo de polímero e/ou das diferentes substâncias adicionadas durante o seu fabrico (Cole *et al.*, 2013; Karami *et al.*, 2017).

Besseling *et al.* (2014) observaram que a exposição crónica a nanoplásticos de poliestireno ( $70 \text{ nm}; > 32 \text{ mg/l}$ ) causa malformações nos embriões de *D. magna* (Besseling *et al.*, 2014). Estes resultados juntamente com os do presente estudo indicam que os nano/microplásticos parecem causar toxicidade na ovogénese e embriogénese de *D. magna*. Assim, será importante que trabalhos futuros com *D. magna* e nano/microplásticos estudem os efeitos destas partículas nestes processos biológicos, atentando aos mecanismos de toxicidade anteriormente discutidos. Estes mecanismos de toxicidade podem não ter sido “suficientes” para diminuir a fecundidade ou o crescimento das dáfrias, mas podem ter sido “suficientes” para causar ovos menos nutridos ou danificados.

O aumento do número de ovos abortados em relação ao controlo foi observado na concentração de microplásticos mais baixa ( $0,05 \text{ mg/l}$ ) mas não foi observado na concentração mais alta ( $0,1 \text{ mg/l}$ ). Este fenómeno foi anteriormente observado num estudo com microplásticos de polietileno ( $< 60 \mu\text{m}$  de tamanho) e o peixe de água doce *C. gariepinus*, onde uma concentração de microplásticos mais baixa ( $0,05 \text{ mg/l}$ ) foi mais tóxica para a saúde dos animais do que uma concentração mais elevada ( $0,5 \text{ mg/l}$ ) (Karami *et al.*, 2016). No presente trabalho, esta observação pode ser explicada pelo facto de uma concentração de microplásticos mais elevada poder implicar uma excreção mais rápida dos microplásticos através das fezes, como observado por Ogonowski *et al.* 2016. Consequentemente houve menos tempo para os microplásticos causarem efeitos tóxicos dentro dos organismos, como por exemplo libertação de substâncias químicas.

A presença de microplásticos no meio pode tornar os organismos mais vulneráveis a outros contaminantes (Besseling *et al.*, 2014). Contudo, foi aqui mostrado que a presença de microplásticos no meio de teste não influencia a toxicidade do

dimetoato no crescimento e reprodução de *D. magna* uma vez que não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos com o dimetoato apenas e os tratamentos das misturas. Porém, foi observado que a presença de dimetoato pode influenciar a toxicidade dos microplásticos dado que o número de ovos abortados foi significativamente menor no tratamento contendo 0,05 mg/l de microplásticos e 0,25 mg/l de dimetoato comparativamente ao tratamento contendo a respectiva concentração de microplásticos isoladamente. Parece que o dimetoato na concentração 0,250 mg/l reduz a toxicidade dos microplásticos. O dimetoato tem como mecanismo primário de ação a inibição da AChE (Schoy et al., 2016), assim, dois mecanismos mutuamente exclusivos podem explicar este fenómeno (i) o dimetoato na concentração de 0,25 mg/l causou movimentos mais rápidos dos apêndices das dáfrias, aumentando a taxa de filtração de alga e de microplásticos e consequentemente a sua ingestão; por um lado, mais nutrientes estavam disponíveis e equilibraram o stresse provocado pelos microplásticos, por outro, como mostrado por Ogonowski *et al.* (2016), uma maior ingestão de microplásticos pode significar que a sua excreção através das fezes foi mais rápida, logo houve menos tempo para os microplásticos causarem efeitos tóxicos nos organismos (Day e Kaushik, 1987) ou (ii) o dimetoato na concentração de 0,25 mg/l provocou a inibição dos movimentos de limpeza pelas garras pós-abdominais para remoção dos microplásticos do aparelho filtrador e assim não ocorreram os efeitos causados por este movimento, como perda dos ovos da câmara incubadora, ruptura da membrana dos ovos e diminuição das taxas de ingestão de alga.

## 5. CONCLUSÕES

A técnica de espectrofotometria UV-vis foi considerada adequada para determinar as concentrações reais de Cr(VI) (0,25 – 1,06 mg/l) nas condições experimentais usadas, e consequentemente de dicromato de potássio (0,7 – 3,0 mg/l) bem como o decaimento do Cr(VI) no meio de teste durante o bioensaio agudo efetuado para avaliação da sensibilidade das culturas parentais. Em contraste, a técnica de espectrofluorimetria não foi considerada adequada para determinar as concentrações de microplásticos testadas nos bioensaios agudo e crónico (0,05 – 1,25 mg/l).

No bioensaio agudo com o dicromato de potássio, obteve-se uma  $CL_{50}$  às 24 h de 0,652 mg/l, a qual está dentro do intervalo recomendado pela OCDE para organismos saudáveis, pelo que as culturas parentais de *D. magna* foram consideradas adequadas para realizar os bioensaios para avaliação dos efeitos do dimetoato e dos microplásticos.

No bioensaio agudo com o dimetoato, após 72 h de exposição obteve-se uma  $CL_{50}$  de 1,332 mg/l, a qual se encontra na gama de valores referidos na literatura após 48 h exposição (1,1 mg/l e 1,5 mg/l), pelo que foi concluído que o dimetoato foi menos tóxico para juvenis de *D. magna* no presente trabalho comparativamente à literatura.

No ensaio realizado para avaliação dos efeitos agudos dos microplásticos em juvenis de *D. magna* não se obtiveram efeitos agudos até 1,25 mg/l, o que levou à aceitação da hipótese  $H0_1$ .

No ensaio crónico de 21 dias, onde se avaliaram os efeitos de microplásticos e de dimetoato, individualmente e em misturas, nenhuma das concentrações de dimetoato testadas isoladamente (0,125 mg/l e 0,25 mg/l) induziram efeitos significativos no crescimento ou nos parâmetros reprodutivos testados. Os tratamentos contendo apenas microplásticos (0,05 mg/l e 0,1 mg/l) não causaram efeitos significativos no crescimento, na idade da libertação da primeira ninhada, no número total de juvenis nem no número de juvenis móveis produzidos. No entanto, o tratamento contendo a concentração de microplásticos mais baixa testada (0,05 mg/l) aumentou o número de ovos abortados em relação ao grupo controlo, indicando toxicidade crónica, o que levou à rejeição da hipótese  $H0_2$ . A rejeição desta hipótese leva à aceitação da hipótese alternativa, ou seja que os microplásticos causam toxicidade crónica em *D. magna* na gama de concentrações testada. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos das misturas e os tratamentos contendo o dimetoato isoladamente, pelo que a hipótese  $H0_3$  é aceite. Foi observado, contudo, que o dimetoato pode influenciar a

toxicidade dos microplásticos, uma vez que o número de ovos abortados produzidos no tratamento contendo 0,05 mg/l de microplásticos e 0,25 mg/l de dimetoato foi significativamente menor comparativamente ao tratamento contendo apenas a respetiva concentração de microplásticos.

Os microplásticos parecem causar toxicidade na ovogénese de *D. magna*, assim, será importante estudar futuramente o impacto destas micropartículas neste processo biológico. Para além disso, uma concentração de microplásticos mais baixa foi mais tóxica para *D. magna* do que uma concentração mais elevada, assim, e contrariamente ao que se tem vindo a assumir, concentrações de microplásticos mais baixas e ambientalmente relevantes podem ser provavelmente mais tóxicas para os organismos do que concentrações mais elevadas. Relativamente às potenciais interações toxicológicas entre os microplásticos e o dimetoato, será interessante testar futuramente concentrações de dimetoato mais elevadas, de forma a entendermos melhor não só a influência dos microplásticos na toxicidade do dimetoato como também a influência deste pesticida organofosforado na toxicidade dos microplásticos.

## Lista de referências bibliográficas

Anderson, J.; Coats, J. 2012. Acetylcholinesterase inhibition by nootkatone and carvacrol in arthropods. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102: 124-128.

Andersen, T.; Tjørnhøj, R.; Wollenberger, L.; Slothuus, T.; Baun, A. 2006. Acute and chronic effects of pulse exposure of *Daphnia magna* to dimethoate and primicarb. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25: 1187 – 1195.

Andrady, A. 2011. Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 62: 1596-1605.

Andrady, A.; Neal, M. 2009. Applications and societal benefits of plastics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 364: 1977-1984.

Aktar, M.; Sengupta, D.; Chowdhury, A. 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2: 1-12.

Arthur, C.; Baker, J.; Bamford, H. 2009. Proceedings of the international research workshop on the occurrence, effects, and fate of microplastic marine debris. Setembro 9-11, 2008, NOAA Technical Memorandum NOS-OR&R-30.

ASTM, 1990. Standard practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates and amphibians. American Society for Testing and Materials. Report E-729-80. ASTM, Philadelphia.

Avio, C.; Gorbi, S.; Milan, M.; Benedetti, M.; Fattirini, D.; d'Errico, G.; Pauletto, M.; Bargelloni, L.; Regoli, F. 2015. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environmental Pollution*, 198: 211-222.

Avio, C.; Gorbi, S.; Regoli, F. 2016. Plastics and microplastics in the ocean: from emerging pollutants to emerged threat. *Marine Environmental Research*, 128: 1-10.

Baird, D.; Barber, I.; Bradley, M.; Calow, P.; Soares, A. 1989a. The *Daphnia* bioassay: a critique. *Hydrobiologia*, 188/189: 403-406.

Baird, D.; Barber, I.; Calow, P. 1990. Clonal variation in general responses of *Daphnia magna* Straus to toxic stress. I. Chronic life-history effects. *Functional Ecology*, 4: 399-407.

Baird, D.; Soares, A.; Girling, A.; Barber, I.; Bradley, M.; Calow, P. 1989b. The long-term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicity tests: problems and prospects. In: *Proceedings of the First European Conference on Ecotoxicology*. Lokke, H.; Tyle, H.; Bro-Rasmussen, F. (Eds.). Copenhagen, 144-148.

Barata, C.; Baird, D.; Soares, A.; Guilhermino, L. 2001. Biochemical factors contributing to response variation among resistant and sensitive clones of *Daphnia magna* Straus exposed to ethyl parathion. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49: 155-163.

Barata, C.; Baird, D. 2000. Determining the ecotoxicological mode of action of chemicals from measurements made on individuals: results from instar-based tests with *Daphnia magna* Straus. *Aquatic Toxicology*, 48: 195-209.

Barnes, D.; Galgani, F.; Thompson, R.; Barlaz, M. 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 364:1985-1998.

Batel, A.; Linti, F.; Scherer, M.; Erdinger, L.; Braunbeck, T. 2016. Transfer of benzo[a]pyrene from microplastics to *Artemia nauplii* and further to zebrafish via a trophic food web experiment: CYP1A induction and visual tracking of persistent organic pollutants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35:1656-1666.

Bednarska, A.; Slusarczyk, M. 2013. Effect of non-toxic, filamentous cyanobacteria on egg abortion in *Daphnia magna* under various thermal conditions. *Hydrobiologia*, 715: 151-157.

Besseling E.; Wang, B.; Lüring, M.; Koelmans, A. 2014. Nanoplastic affects growth of *S. obliquus* and reproduction of *D. magna*. *Environmental Science and Technology*, 48: 12336-12343.

Besseling, E.; Foekema, E.; Van Franeker, J.; Leopold, M.; Kuhn, S.; Bravo Rebolledo E.; Heße, E.; Mielke, L.; IJzer, J.; Kamminga, P.; Koelmans A. 2015. Microplastic in a macro filter feeder: Humpback whale *Megaptera novaeangliae*. *Marine Pollution Bulletin*, 95: 248-252.



- Besseling, E.; Wegner, A.; Foekema, E.; van den Heuvel-Greve, M.; Koelmans, A. 2012. Effects of microplastic on fitness and PCB bioaccumulation by the lugworm *Arenicola marina* (L.). *Environmental Science and Technology*, 47:593-600.
- Beusen, J.; Neven, B. 1989. Toxicity of dimethoate to *Daphnia magna* and Freshwater Fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 42: 126-133.
- Biginagwa, F.; Mayoma B.; Shashoua Y.; Syberg, k.; Khan, F.2016. First evidence of microplastics in the African Great Lakes: recovery from Lake Victoria Nile perch and Nile tilapia. *Journal of Great Lakes Research*, 42: 146-149.
- Bradley, M.; Naylor, C.; Calow, P.; Baird, D.; Soares, A. 1993. Reducing variability in *Daphnia* toxicity tests – a case for further standardization of aquatic toxicity tests. In: *Progress in Standardization of Aquatic Toxicity Tests*. Soares, A.; Calow, P (Eds.). Lewis Publishers, Chelsea.
- Brennecke, D.; Ferreira, E.; Costa, T.; Appel, D.; Gama, B.; Lenz, M. 2015. Ingested microplastics (>100 µm) are translocated to organs of the tropical fiddler crab *Uca rapax*. *Marine Pollution Bulletin*, 96: 491-495.
- Browne, M.; Dissanayake, A.; Galloway, T.; Lowe, D.; Thompson, R. 2088. Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environmental Science and Technology*, 42:5026-5031.
- Chen, J.; Guo, R. 2015. The process-dependent impacts of dimethoate on the feeding behavior of rotifer. *Chemosphere*, 119: 318-325.
- Chen, J.; Wang, Z.; Li, G.; Guo, R. 2014. The swimming speed alteration of two freshwater rotifers *Brachionus calyciflorus* and *Asplanchna brightwelli* under dimethoate stress. *Chemosphere*, 95:256-260.
- Chua, E.; Shimeta, J.; Nuggeoda, D.; Morrison, P.; Clarke, B. 2014. Assimilation of polybrominated diphenyl ethers from microplastics by the marine amphipod, *Allorchestes compressa*. *Environmental Science and Technology*, 48:8127-8134.

Cole, M.; Lindeque, P.; Fileman, E.; Halsband, C.; Goodhead, R.; Moger, J.; Gallowat, T. 2013. Microplastic ingestion by zooplankton. *Environmental Science and Technology*, 47:6646-6655.

Cole, M.; Lindeque, P.; Halsband, C.; Galloway, T. 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 62: 2588-2597.

de Sá.; Luís, L.; Guilhermino, L. 2015. Effects of microplastics on juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): confusion with prey, reduction of the predatory performance and efficiency, and possible influence of developmental conditions. *Environmental Pollution*, 196: 359-362.

Dabrunz, A.; Duester, L.; Prasse, C.; Seitz, F.; Rosenfeldt, R.; Schilde, C.; Schaumann, G.; Schulz, R.; Schnur, J. 2011. Biological surface coating and molting inhibition as mechanisms of TiO<sub>2</sub> nanoparticle toxicity in *Daphnia magna*. *PLoS One*, 6:e20112.

Daym K.; Kaushik, N. 1897. Short-term exposure to zooplankton to the synthetic pyrethroid, fenvalerate, and its effects on rats of filtration and assimilation of the alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Archive of Environmental Contamination and Toxicology*, 16: 423-432.

DGADR, 2011. Venda de produtos fitofarmacêuticos em Portugal em 2010. Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural, Lisboa.

Depledge, M.; Galgani, F.; Panti, C.; Caliani, I.; Casini, S.; Fossi, M. 2013. Plastic litter in the sea. *Marine Environmental Research*, 92: 279-281.

Derraik, J. 2002. The pollution of marine environment by plastic debris: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 44: 842-852.

de Sherbinin. A.; Carr, D.; Casseis, S.; Jlang, L. 2007. Population and Environment. *Annual Review of Environmental and Resources*. 32: 345-373.

Desforges, J.; Galbraith, M.; Dangerfield, N.; Ross, P. 2014. Widespread distribution of microplastics in subsurface seawater in the NE Pacific Ocean. *Marine Pollution Bulletin*, 79:94-99

Desforbes, J.; Galbraith M.; Ross, P. 2015. Ingestion of microplastics by zooplankton in the Northeast Pacific Ocean. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 69:320-330.

Devriese L.; van der Meulen, M.; Maes, T.; Bekaert K.; Paul-Pont, I.; Frère L.; Robbens, J.; Vethaak A. 2015. Microplastic contamination in brown shrimp (*Crangon crangon*, Linnaeus 1758) from coastal waters of the Southern North Sea and Channel are. *Marine Pollution Bulletin*, 98:179-187.

Diamantino, T.; Guilhermino, L.; Almeida, E.; Soares, A. 2000. Toxicity of sodium molybdate and sodium dichromate to *Daphnia magna* Straus evaluated in acute, chronic, and acetylcholinesterase inhibition tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45: 253-259.

Dogan, D.; Can, C. 2011. Endocrine disruption and altered biochemical indices in male *Oncorhynchus mykiss* in response to dimethoate. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99:157-161.

Dogan, D.; Can, C.; Kocyigit, A.; Dikilitas, M.; Taskin, A.; Bilinc, H. 2011. Dimethoate-induced oxidative stress and DNA damage in *Oncorhynchus mykiss*. *Chemosphere*, 84:39-46.

Dunlap, R.; Jorgenson, A. 2012. Environmental problems. In: *The Wiley-Blackwell Encyclopedia of Globalization*. Ritzer G. (Ed.). Blackwell Publishing.

Ebert, D. 2005. Introduction to *Daphnia* biology. In: *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, 5-18.

Erkes-Medrano, D.; Thompson, R.; Aldridge, D. 2015. Microplastic in freshwater systems: a review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. *Water Research*, 75:63-82.

Faure, F.; Demars, C.; Wieser, O.; Kunz, M.; de Alencastro, F. 2015. Plastic pollution in Swiss surface waters: nature and concentrations, interaction with pollutants. *Environmental Chemistry*, 12: 582-591.

Ferreira, P.; Fonte, E.; Soares, M.; Carvalho, F.; Guilhermini, L. Effects of multi-stressors on juveniles of the marine fish *Pomatoschistus microps*: gold nanoparticles, microplastics and temperature. *Aquatic Toxicology*, 170: 89-103.

Finney, D., 1971. *Probit Analysis*. Cambridge University Press, Cambridge.

Fonte, E.; Ferreira, P.; Guilhermino, L. 2016. Temperature rise and microplastics interact with the toxicity of the antibiotic cefalexin to juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): post-exposure predatory behaviour, acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation. *Aquatic Toxicology*, 180: 173-185.

Frasco, M.; Guilhermino, L. 2002. Effects of dimethoate and beta-naphthoflavone on selected biomarkers of *Poecilia reticulata*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26: 149-156.

Free, C.; Jensen, O.; Mason, S.; Eriksen, M.; Williamson, N.; Boldgiv, B. 2014. High-levels of microplastic pollution in a large, remote, mountain lake. *Marine Pollution Bulletin*, 85:156-163.

Frias, J.; Otero, V.; Sobral, P. 2014. Evidence of microplastics in samples of zooplankton from Portuguese coastal waters. *Marine Environmental Research*, 95: 89-95.

Gao, J.; Liu, L.; Liu, X.; Zhou, H.; Wang, Z. 2009. The occurrence and spatial distribution of organophosphorous pesticides in Chinese surface water. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82:223-229.

Gevao, B.; Semple, K.; Jones, K. 2000. Bound pesticides residues in soils: a review. *Environmental Pollution*, 108: 3-14.

Götz, R.; Bauer, H.; C. Roch, K. 1998. Organic trace compounds in the water of the River Elbe near Hamburg Part II. *Chemosphere*, 36:2103-2118.

Guilhermino, L.; Lacerda, M.; Nogueira, A.; Soares, A. 2000. In vitro and in vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring. *The Science and the Total Environment*, 247: 137-141.

Guilhermino, L. 1996. Modelos e sistemas de avaliação da toxicidade de substâncias químicas. Tese de Doutoramento. Universidade de Coimbra, Coimbra.

Guo, R.; Ren, X.; Ren, H. 2012. Assessment of toxic effects of dimethoate to rotifer using swimming behavior. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 89:568-571.

Haemer, J.; Gutow, L.; Koehler, A.; Saborowski R. 2014. The fate of microplastics in the marine isopod *Idotea emarginata*. *Environmental Science and Technology*, 48: 13451-13458.

Hartmann, N.; Rist, S.; Bodin, J.; Jensen, L.; Schmidt, S.; Mayer, P.; Meibom, A.; Baun, A. 2017. Microplastics as vectors for environmental contaminants: exploring sorption, desorption, and transfer to biota. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 13: 488-493.

Hidalgo-Ruz, V.; Gutow, L.; Thompson, R.; Thiel, M. 2012. Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. *Environmental Science and Technology*, 46: 3060-3075.

Hopewell, J.; Dvorak, R.; Kosior, E. 2009. Plastics recycling: challenges and opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 364:2115-2126.

ICH, 2005. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva.

Imhof, H.; Laforsch, C. 2016. Hazardous or not – Are adult and juvenile individuals of *Potamopyrgus antipodarum* affected by non-buoyant microplastic particles? *Environmental Pollution*, 218: 383-391.

Ivar do Sul, J.; Costa, M. 2014. The present and future of microplastic pollution in the marine environment. *Environmental Pollution*, 185:352-364.

Jemec, A.; Horvat, P.; Kunej, U.; Bele, M.; Krzan, A. 2016. Uptake and effects of microplastic textile fibers on freshwater crustacean *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*, 219: 201-209.

Jeong, C.; Won, E.; Kang, H.; Lee, M.; Hwang, D.; Hwang, D.; Hwang, U.; Zhou, B.; Souissi, S.; Lee, S.; Lee, J. 2016. Microplastic size-dependent toxicity, oxidative stress

induction, and p-JNK and p-p38 activation in the monogonont rotifer (*Brachionus koreanus*). *Environmental Science and Technology*, 50: 8849-8857.

Karami, A.; 2017. Gaps in aquatic toxicological studies of microplastics. *Chemosphere*, 184: 841 – 848.

Karami, A.; Romano, N.; Galloway, T.; Hamzah, H. 2016. Virgin microplastics cause toxicity and modulate the impacts of phenanthrene on biomarker response (*Clarias gariepinus*). *Environmental Research* 151:58-70.

Kaposi, K.; Mos, B.; Kelaher, B.; Dworjany, S. 2013. Ingestion of microplastic has limited impact on a marine larva. *Environmental Science and Technology*, 48:1638-1645.

Karnes, H.; Shiu, G.; Shah, V. 1991. Validation of bioanalytical methods. *Pharmaceutical Research* 8:421-426.

Klein, S.; Worch, E.; Knepper, T. 2015. Occurrence and spatial distribution of microplastics in river shore sediments of the Rhine-main area in Germany. *Environmental Science and Technology*, 49:6070-6076.

Koelmans, A.; Bakir, A.; Burton A.; Jasse, C. 2016. Microplastic as a vector for chemicals in the aquatic environment: critical review and model-supported reinterpretation of empirical studies. *Environmental Science and Technology*, 50:3315-3326.

Koelmans, A. 2015. Modeling the role of microplastics in bioaccumulation of organic chemicals to marine aquatic organisms. A critical review. In: *Marine Anthropogenic Litter*. Bergmann, M. (Ed.). Springer International Publishing, 309-324.

Koivisto, S. 1995. Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests? *Environmental Pollution*, 90: 263-267.

Lambert, S.; Wagner, M. 2016. Exploring the effects of microplastics in freshwater environments. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 2: 404-405.

Lee, K.; Shim, W.; Kwon, Oh.; Kang, J. 2013. Size-dependent effects of micro polystyrene particles in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Environmental Science Technology*, 47:11278-11283.

Lechner, A.; Keckeis, H.; Lumesberger-Loisi, F.; Zens, B.; Krusch, R.; Tritthart, M.; Glas, M.; Schludermann, E. 2014. The Danube so colourful: a potpourri of plastic litter outnumbered fish larvae in Europe's second largest river. *Environmental Pollution*, 188:177-181.

Lisker, E.; Ensminger, M.; Gill, S.; Goh, K. 2011. Detections of eleven organophosphorus insecticides and one herbicide threatening Pacific salmonids, *Oncorhynchus* spp., in California, 1991-2010. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 87:355-360.

Lönnstedt, O.; Eklöv, P. 2016. Environmentally relevant concentrations of microplastic particles influence larval fish ecology. *Science*, 352: 1213-1216.

Luís, L.; Ferreira, P.; Fonte, E.; Oliveira, M.; Guilhermino, L. 2015. Does the presence of microplastics influence the acute toxicity of chromium(VI) to early juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*)? A study with juveniles from two wild estuarine populations. *Aquatic Toxicology*, 164: 163-174.

Lusher, A.; McHugh M.; Thompson, R. 2013. Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. *Marine Pollution Bulletin*, 67: 94-99.

Mani, T.; Hauk, A.; Walter, U.; Burkhardt-Holm, P. 2015. Microplastics profile along the Rhine River. *Scientific Reports*, 5:1-7.

Moore, C.; Lattin, G.; Zellers, A. 2011. Quantity and type of plastic debris flowing from two urban rivers to coastal waters and beaches of Southern California. *Journal of Integrated Coastal Zone Management*, 11: 65-73.

Mazurais, D.; Ernande, B.; Quazuguel, P.; Severe, A.; Huelvan, C.; Madec, L.; Mouchel, O.; Soudant, P.; Robbens, J.; Huvet, A.; Zambonino-Infante, J. 2015. Evaluation of the impact of polyethylene microbeads ingestion in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Marine Environmental Research*, 112: 78-85.

Neves, D.; Sobral, P.; Ferreira, J.; Pereira, T. 2015. Ingestion of microplastics by commercial fish off the Portuguese coast. *Marine Pollution Bulletin*, 101: 119-126.

Norén, 2007. Small plastic particles in coastal Swedish waters. KIMO, Sweden.

OECD, 2012. OECD guideline for the testing of chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* reproduction test, adopted 2 October 2012. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

OECD, 2004. OECD guideline for the testing of chemicals. Guideline 202: *Daphnia* sp. acute immobilisation test, adopted 13 April 2004. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

OECD, 2006. OECD guideline for the testing of chemicals. Guideline 201: freshwater Alga and cyanobacteria, growth inhibition test, adopted 23 March 2006. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

Oliveira, M.; Ribeiro, A.; Hylland, K.; Guilhermino, L. 2013. Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Ecological Indicators*, 34:641-647.

Ogonowski, M.; Schür, C.; Jarsén, A.; Gorokhova, E. 2016. The effects of natural and anthropogenic microparticles on individual fitness in *Daphnia magna*. *PLoS ONE*, 11.

Pedà, C.; Caccamo, L.; Fossi, M.; Gai, F.; Andaloro, F.; Genovese, L.; Perdicizzi, A.; Romeo, T.; Maricchiolo, G. 2016. Intestinal alterations in European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) exposed to microplastics: preliminary results. *Environmental Pollution*, 212: 251-256.

Persoone, G.; Baudo, R.; Cotman, M.; Blaise, C.; Thompson, K.; Moreira-Santos, M.; Vollate, B.; Törökne, B.; Han, T. 2009. Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test – Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*. 29 pp.

Peters, C.; Bratton, S.; Urbanization is a major influence on microplastic ingestion by sunfish in the Brazos River Basin, Central Texas, USA. *Environmental Pollution*, 210: 380-387.



Plastics Europe, 2013. Plastics – The facts 2013, an analysis of European latest plastics production, demand and waste data. *Plastics Europe*, Brussels.

Plastics Europe, 2015. Plastics – The facts 2015, an analysis of European plastics production, demand and waste data. *Plastics Europe*. Brussels.

Phuong, N.; Zalouk-Vergnoux, A.; Poirier, L.; Kamari, A.; Châtel, A.; Mouneyrac, C.; Lagarde, F. 2016. Is there any consistency between the microplastics found in the field and those used in laboratory experiments? *Environmental Pollution*, 211: 11-123.

Radović, T.; Grujić, S.; Petković, A.; Dimikić, M.; Lausević, M. 2015. Determination of pharmaceuticals and pesticides in river sediments and corresponding surface and ground water in the Danube River and tributaries in Serbia. *Environmental Monitoring and Assessment*, 198:4092-4109.

Rehse, S.; Kloas, W.; Zarfl, C. 2016. Short-term exposure with high concentrations of pristidine microplastic particles leads to immobilisation of *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 153: 91-99.

Rist, S.; Assidqi, K.; Zamani, N.; Appel, D.; Perschke, M.; Huhn, M.; Lenz, M. 2016. Suspended micro-sized PVC particles impair the performance and decrease survival in the Asian green mussel *Perna viridis*. *Marine Pollution Bulletin*, 111:213-220.

Rist, S.; Baun, A.; Hartmann, N. 2017. Ingestion of micro- and nanoplastics in *Daphnia magna* – Quantification of body burdens and assessment of feeding rates and reproduction. *Environmental Pollution*, 228: 398 – 407.

Rochman, C.; Hoh, E.; Kurobe, T.; Teh, S. 2013. Ingested plastic transfer hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. *Scientific Reports*, 3: 3263-3270.

Rosenkranz, P.; Chaudhry, Q.; Stone, V.; Fernandes, T. 2009. A comparison of nanoparticle and fine particle uptake by *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28: 2142-2149.

Sauvé, S.; Desrosiers, M. 2014. A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central Journal*. 8:15.

Scoy, A.; Pennell, A.; Zhang, X. 2016. Environmental fate and toxicology of dimethoate, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 237: 53-70.

Sena, M.; Scarminio, I.; Collins, K.; Collis, C. 2000. Speciation of aqueous chromium (VI) solutions with aid of Q-mode factor analysis followed by oblique projection. *Talanta*, 53:453-461.

Setälä, O.; Fleming-Lehtinen, V.; Lehtiniemi, M. 2014. Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. *Environmental Pollution*, 185:77-83.

Shah, A.; Hasan, F.; Hameed, A.; Ahmed, S. 2008. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 26: 246-265.

Shrivastava, A.; Gupta, V. 2011. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantification of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*, 2: 21-25.

Soares, A., 1989. Clonal variation in life-history traits in *Daphnia magna* Straus (Crustacea, Cladocera). Implications for ecotoxicology. Ph.D. Thesis. University of Sheffield, Sheffield.

Sussarellu, R.; Suquet, M.; Thomas, Y.; Lambert, C.; Fabioux, C.; Pernet, M.; Göic, N.; Quillien, V.; Mingant, C.; Epelboin, Y.; Corporeau, C.; Guyomarch, J.; Robbens, J.; Paul-Pont, I.; Soudant, P.; Huvet, A. 2016. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113:2430-2435.

Stein, J., 1973. *Handbook of Phycological Measurements: Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, Cambridge.

Syberg, K.; Khan, F.; Selck, H.; Palmqvist, A.; Banta G.; Daley, J.; Sano L.; Duhaime M. 2015. Microplastics: addressing ecological risk through lessons learned. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24: 945-953.

Tauler, R.; Azevedo, D.; Lacorte, S.; Céspedes, S.; Viana, P.; Barceló, D. 2001. Organic pollutants in surface waters from Portugal using chemometric interpretation. *Environmental Technology*, 22:1043-1054.

Teuten, E.; Saquing, J.; Knappe, D.; Barlaz, M.; Jonson, S.; Björn, A.; Rowland, S.; Thompson, R.; Galloway, T.; Yamashita, R.; Ochi, D.; Watanuki, Y.; Moore, C.; Viet, P.; Tana, T.; Prudente, Y.; Boonyatumanond, R.; Zakaria, M.; Akkhavong, K.; Ogata, Y.; Hirari, H.; Iwasa, S.; Mizukawa, K.; Hagino, Y.; Imamura, A.; Saha, M.; Takada, H. 2009. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 364: 2027-2045.

Thomatou, A.; Lerotheos, Z.; Hela, D.; Konstantinou, I.; 2013. Determination and risk assessment of pesticide residues in Lake Amvrakia (W. Greece) after agricultural and use changes in the lake's drainage basin. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 93: 1-20.

Ton, S.; Chang, S.; Hsu, L.; Wang, M.; Wang, K. 2012. Evaluation of acute toxicity and teratogenic effects of disinfectants by *Daphnia magna* embryo assay. *Environmental Pollution*, 168: 54-61.

Van Gauwenberghe, L.; Claessens, M.; Vandeghechuchte, M.; Jansen, C. 2015. Microplastics are taken up by mussels (*Mytilus edulis*) and lugworms (*Arenicola marina*) living in natural habitats. *Environmental Pollution*, 199:10-17.

Vasile, C.; Pascu, M. 2005. *Practical Guide to Polyethylene*. Rapra Technology Limited, Shrewsbury.

von Moos, N.; Burkhardt-Holm, P.; Köhler, A. 2012. Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. *Environmental Science and Technology*, 46:11327-11335.

Wagner, M.; Scherer, C.; Alvarez-Munoz, D.; Brennholt, N.; Bourrain, X.; Buchinger, S.; Fries, E.; Grosbois, C.; Klasmeier, J.; Marti, T.; Rodriguez-Mozaz, S.; Urbatzka, R.; Vethaak, D.; Winther-Nielsen, M.; Reifferscheid, G. 2014. Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. *Environmental Sciences Europe*, 26.

Wang, J.; Tan, Z.; Peng, J.; Qiu, Q.; Li, M. 2016. The behaviours of microplastics in the marine environment. *Marine Environmental Research*, 113: 7-17.

Watts, A.; Lewis, C.; Goodhead, R.; Beckett, S.; Moger, C.; Galloway, T. 2014. Uptake and retention of microplastics by the shore crab *Carcinus maenas*. *Environmental Science and Technology*, 48: 8823-8830.

WHO, 2004. Dimethoate in drinking-water. Background document for the development of WHO Guidelines for drinking-water quality. World Health Organization.

Wong, L.; Kwok, K.; Leung, K.; Wong, C. 2009. Relative sensitivity distribution of freshwater planktonic crustaceans to trace metals. *Human and Ecological Risk Assessment*, 15: 1335-1345.

Wright, S.; Thomposon, R.; Galloway, T. 2013a. The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review. *Environmental Pollution*, 178:483-492

Wright, S.; Rowe, D.; Thompson, R.; Galloway, T. 2013b. Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms. *Current Biology*, 23: R1031-R1033.

Zar, J., 2010. *Biostatistical Analysis*. 5ª edição, Pearson International Edition.

Zhang, K.; Gong, W.; Lv, J.; Xiong, X.; Wu, C. 2015. Accumulation of floating microplastics behind the Three Gorges Dam. *Environmental Pollution*, 204: 117-123.

Ziccardi, L.; Edgington A.; Hentz, K.; Kulacki, K.; Driscoll S. 2016. Microplastics as vectors for bioaccumulation of hydrophobic organic chemicals in the marine environment: a state-of-the-science review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35: 1667-1676.

## **Apêndice A – Número de partículas por litro nas concentrações de microplásticos testadas nos bioensaios agudo e crônico**

**Tabela A.1.** Número de partículas de plástico presente nas concentrações de microplásticos testadas no ensaio agudo com *Daphnia magna*.

Concentração de microplásticos (mg/l)	Número de partículas (nº partículas/l)
0,05	$9,18 \times 10^6$
0,35	$6,43 \times 10^7$
0,65	$1,19 \times 10^8$
0,95	$1,74 \times 10^8$
1,25	$2,3 \times 10^8$

**Tabela A.2.** Número de partículas de plástico presente nas concentrações de microplásticos testadas no ensaio crónico com *Daphnia magna*.

Concentração de microplásticos (mg/l)	Número de partículas (nº partículas/l)
0,05	$9,18 \times 10^6$
0,1	$1,87 \times 10^7$

## Apêndice B – Parâmetros físico-químicos medidos durante os bioensaios

**Tabela B.1.** Parâmetros físico-químicos medidos ao longo das 48 h do ensaio agudo com o dicromato de potássio e *Daphnia magna*. Os dados são a média  $\pm$  desvio padrão (n = 4).

Parâmetro	Tratamento	0 h	24 h	48 h
pH	Controlo	8,31 ± 0,10	8,39 ± 0,06	8,16 ± 0,01
	0,7	8,37 ± 0,02	8,44 ± 0,02	8,13 ± 0,02
	0,84	8,36 ± 0,01	8,39 ± 0,06	8,10 ± 0,02
	1,0	8,41 ± 0,02	8,47 ± 0,01	8,06 ± 0,02
	1,21	8,43 ± 0,02	8,47 ± 0,01	8,05 ± 0,01
	1,45	8,40 ± 0,01	8,45 ± 0,00	7,98 ± 0,01
	1,74	8,41 ± 0,00	8,46 ± 0,02	7,94 ± 0,01
	2,08	8,46 ± 0,04	8,48 ± 0,01	7,90 ± 0,01
	2,5	8,45 ± 0,03	8,48 ± 0,01	7,85 ± 0,01
	3,0	8,44 ± 0,01	8,48 ± 0,01	7,84 ± 0,01
Temperatura (°C)	Controlo	21,9 ± 0,1	19,7 ± 0,0	18,0 ± 0,0
	0,7	21,6 ± 0,1	19,6 ± 0,0	17,8 ± 0,0
	0,84	21,5 ± 0,1	19,7 ± 0,0	17,7 ± 0,0
	1,0	21,4 ± 0,1	19,0 ± 0,0	17,7 ± 0,0
	1,21	21,4 ± 0,1	19,6 ± 0,0	17,7 ± 0,0
	1,45	21,5 ± 0,1	19,6 ± 0,0	17,8 ± 0,0
	1,74	21,8 ± 0,0	19,7 ± 0,0	17,7 ± 0,1
	2,08	21,7 ± 0,1	19,7 ± 0,1	17,7 ± 0,0
	2,5	21,7 ± 0,0	19,7 ± 0,0	17,7 ± 0,1
	3,0	21,7 ± 0,0	19,8 ± 0,1	17,8 ± 0,1
Oxigénio dissolvido (mg/l)	Controlo	17,38 ± 1,02	9,67 ± 1,34	12,36 ± 0,65
	0,7	18,56 ± 0,50	8,36 ± 0,16	10,99 ± 0,08
	0,84	18,85 ± 0,21	8,16 ± 0,01	12,52 ± 0,12
	1,0	18,77 ± 0,24	8,52 ± 0,01	11,37 ± 0,09
	1,21	18,67 ± 0,39	8,45 ± 0,03	13,16 ± 0,10
	1,45	18,36 ± 0,27	9,11 ± 0,02	12,99 ± 0,19
	1,74	18,42 ± 0,66	9,29 ± 0,02	12,73 ± 0,25
	2,08	16,90 ± 0,02	9,50 ± 0,05	12,51 ± 0,04
	2,5	16,93 ± 0,06	10,42 ± 0,17	13,11 ± 0,09

<b>3,0</b>	17,23 ± 0,12	13,84 ± 0,11	12,90 ± 0,24
------------	--------------	--------------	--------------

**Tabela B.2.** Parâmetros físico-químicos medidos ao longo das 96 h do ensaio agudo com o dimetoato e *Daphnia magna*. Os dados são a média ± desvio-padrão (n = 4).

<b>Parâmetro</b>	<b>Tratamento</b>	<b>0 h</b>	<b>48 h</b>	<b>96 h</b>
<b>pH</b>	<b>Controlo</b>	7,92 ± 0,05	8,22 ± 0,04	8,32 ± 0,09
	<b>0,2</b>	7,99 ± 0,01	8,30 ± 0,01	8,40 ± 0,02
	<b>0,5</b>	8,01 ± 0,01	8,32 ± 0,01	8,44 ± 0,01
	<b>0,8</b>	8,01 ± 0,00	8,34 ± 0,01	8,43 ± 0,01
	<b>1,1</b>	8,00 ± 0,01	8,36 ± 0,01	8,43 ± 0,00
	<b>1,4</b>	7,99 ± 0,00	8,37 ± 0,01	8,45 ± 0,01
	<b>1,7</b>	7,98 ± 0,01	8,37 ± 0,01	8,44 ± 0,01
	<b>2,0</b>	7,95 ± 0,01	8,39 ± 0,01	8,45 ± 0,01
	<b>2,3</b>	7,93 ± 0,01	8,39 ± 0,00	8,45 ± 0,01
<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Controlo</b>	19,8 ± 0,0	19,7 ± 0,2	20,0 ± 0,3
	<b>0,2</b>	19,9 ± 0,1	19,4 ± 0,1	19,7 ± 0,2
	<b>0,5</b>	20,0 ± 0,1	19,2 ± 0,1	19,6 ± 0,1
	<b>0,8</b>	20,1 ± 0,1	19,3 ± 0,1	19,5 ± 0,2
	<b>1,1</b>	20,0 ± 0,1	19,3 ± 0,1	19,6 ± 0,1
	<b>1,4</b>	20,0 ± 0,1	19,3 ± 0,0	19,6 ± 0,0
	<b>1,7</b>	20,1 ± 0,1	19,2 ± 0,0	19,6 ± 0,1
	<b>2,0</b>	20,1 ± 0,1	19,3 ± 0,1	19,6 ± 0,1
	<b>2,3</b>	20,0 ± 0,2	19,4 ± 0,1	19,7 ± 0,1
<b>Oxigénio dissolvido (mg/l)</b>	<b>Controlo</b>	8,95 ± 0,02	8,61 ± 0,29	8,77 ± 0,04
	<b>0,2</b>	8,94 ± 0,04	8,89 ± 0,01	8,86 ± 0,02
	<b>0,5</b>	8,87 ± 0,02	8,98 ± 0,01	8,83 ± 0,06
	<b>0,8</b>	8,86 ± 0,02	8,92 ± 0,02	8,80 ± 0,03
	<b>1,1</b>	8,85 ± 0,02	8,96 ± 0,03	8,79 ± 0,04
	<b>1,4</b>	8,88 ± 0,02	8,93 ± 0,02	8,88 ± 0,11
	<b>1,7</b>	8,87 ± 0,03	8,90 ± 0,04	8,86 ± 0,10

<b>2,0</b>	8,87 ± 0,01	8,91 ± 0,05	8,86 ± 0,04
<b>2,3</b>	8,91 ± 0,01	8,78 ± 0,06	8,90 ± 0,05

**Tabela B.3.** Parâmetros físico-químicos medidos a diferentes períodos de exposição no meio novo do ensaio agudo com os microplásticos e *Daphnia magna*. Os dados são a média ± desvio-padrão (n = 4).

Parâmetro	Tratamento	0 h	24 h	48 h	72 h
<b>pH</b>	<b>Controlo</b>	7,55 ± 0,10	7,21 ± 0,09	8,12 ± 0,01	7,95 ± 0,01
	<b>0,05</b>	7,79 ± 0,05	7,49 ± 0,06	8,12 ± 0,00	7,90 ± 0,01
	<b>0,35</b>	7,92 ± 0,03	7,62 ± 0,04	8,12 ± 0,00	7,86 ± 0,03
	<b>0,65</b>	8,00 ± 0,02	7,74 ± 0,02	8,11 ± 0,00	7,84 ± 0,02
	<b>0,95</b>	8,04 ± 0,01	7,80 ± 0,01	8,11 ± 0,00	8,01 ± 0,11
	<b>1,25</b>	8,06 ± 0,00	7,82 ± 0,01	8,11 ± 0,00	8,04 ± 0,02
<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Controlo</b>	19,6 ± 0,1	20,0 ± 0,1	19,9 ± 0,1	20,0 ± 0,0
	<b>0,05</b>	19,6 ± 0,1	20,0 ± 0,1	19,8 ± 0,3	20,1 ± 0,1
	<b>0,35</b>	19,6 ± 0,1	20,0 ± 0,1	20,0 ± 0,2	20,1 ± 0,1
	<b>0,65</b>	19,6 ± 0,0	20,0 ± 0,2	20,1 ± 0,1	19,9 ± 0,1
	<b>0,95</b>	19,6 ± 0,1	19,6 ± 0,1	20,0 ± 0,1	20,0 ± 0,2
	<b>1,25</b>	20,0 ± 0,2	19,9 ± 0,1	20,0 ± 0,2	20,0 ± 0,1
<b>Oxigénio dissolvido (mg/l)</b>	<b>Controlo</b>	8,87 ± 0,02	8,87 ± 0,01	8,87 ± 0,09	8,85 ± 0,09
	<b>0,05</b>	8,86 ± 0,02	8,87 ± 0,04	8,84 ± 0,06	8,87 ± 0,05
	<b>0,35</b>	8,85 ± 0,02	8,90 ± 0,04	8,81 ± 0,02	8,91 ± 0,06
	<b>0,65</b>	8,93 ± 0,04	8,77 ± 0,04	8,78 ± 0,01	8,95 ± 0,02
	<b>0,95</b>	8,95 ± 0,02	8,81 ± 0,05	8,89 ± 0,10	8,92 ± 0,03
	<b>1,25</b>	8,90 ± 0,02	8,84 ± 0,09	8,81 ± 0,09	8,86 ± 0,01

**Tabela B.4.** Parâmetros físico-químicos medidos a diferentes períodos de exposição no meio velho do ensaio agudo com os microplásticos e *Daphnia magna*. Os dados são a média ± desvio-padrão (n = 4).

Parâmetro	Tratamento	24 h	48 h	72 h	96 h
-----------	------------	------	------	------	------



<b>pH</b>	<b>Controlo</b>	7,94 ± 0,01	7,82 ± 0,01	8,12 ± 0,01	8,03 ± 0,05
	<b>0,05</b>	7,94 ± 0,00	7,82 ± 0,00	8,12 ± 0,00	8,05 ± 0,01
	<b>0,35</b>	7,93 ± 0,00	7,82 ± 0,01	8,12 ± 0,00	7,98 ± 0,01
	<b>0,65</b>	7,93 ± 0,00	7,82 ± 0,00	8,11 ± 0,00	7,95 ± 0,01
	<b>0,95</b>	7,93 ± 0,01	7,83 ± 0,00	8,11 ± 0,00	7,93 ± 0,01
	<b>1,25</b>	7,92 ± 0,00	7,83 ± 0,01	8,11 ± 0,00	8,22 ± 0,04
<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Controlo</b>	19,9 ± 0,1	20,0 ± 0,0	19,6 ± 0,1	20,0 ± 0,1
	<b>0,05</b>	19,8 ± 0,3	20,1 ± 0,1	19,6 ± 0,1	20,0 ± 0,1
	<b>0,35</b>	20,0 ± 0,2	20,1 ± 0,1	19,6 ± 0,1	20,0 ± 0,1
	<b>0,65</b>	20,1 ± 0,1	19,9 ± 0,1	19,6 ± 0,0	20,0 ± 0,2
	<b>0,95</b>	20,0 ± 0,1	20,0 ± 0,2	19,6 ± 0,1	19,6 ± 0,1
	<b>1,25</b>	20,0 ± 0,2	20,0 ± 0,1	20,0 ± 0,2	19,9 ± 0,1
<b>Oxigénio dissolvido (mg/l)</b>	<b>Controlo</b>	8,85 ± 0,09	8,85 ± 0,09	8,85 ± 0,09	8,86 ± 0,02
	<b>0,05</b>	8,87 ± 0,05	8,88 ± 0,05	8,87 ± 0,05	8,42 ± 0,49
	<b>0,35</b>	8,91 ± 0,06	8,91 ± 0,06	8,91 ± 0,06	7,99 ± 0,01
	<b>0,65</b>	8,95 ± 0,02	8,95 ± 0,02	8,95 ± 0,02	7,95 ± 0,01
	<b>0,95</b>	8,92 ± 0,03	8,92 ± 0,03	8,89 ± 0,03	8,92 ± 0,01
	<b>1,25</b>	8,90 ± 0,01	8,86 ± 0,02	8,86 ± 0,01	7,95 ± 0,04

**Tabela B.5.** Parâmetros físico-químicos medidos na primeira, segunda e terceira semana, no meio novo e velho, do ensaio crónico para testar os efeitos dos microplásticos e do dimetoato no crescimento somático e reprodução de *Daphnia magna*. Os dados são a média ± desvio-padrão. (n = 6 ou 7).

<b>Parâmetro</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Meio</b>	<b>1ª semana</b>	<b>2ª semana</b>	<b>3ª semana</b>
<b>pH</b>	<b>Controlo</b>	Novo	8,27 ± 0,03	8,29 ± 0,15	7,70 ± 0,75
		Velho	8,52 ± 0,27	8,27 ± 0,12	7,97 ± 0,41

	<b>0,05MP</b>	Novo	8,28 ± 0,04	8,26 ± 0,05	8,02 ± 0,13
		Velho	8,34 ± 0,13	8,05 ± 0,22	8,06 ± 0,22
	<b>0,1MP</b>	Novo	8,25 ± 0,03	8,24 ± 0,02	7,92 ± 0,45
		Velho	8,33 ± 0,12	8,16 ± 0,10	8,11 ± 0,07
	<b>0,125D</b>	Novo	8,25 ± 0,03	8,23 ± 0,06	7,67 ± 0,54
		Velho	8,37 ± 0,09	8,13 ± 0,15	8,25 ± 0,22
	<b>0,25D</b>	Novo	8,25 ± 0,06	8,21 ± 0,02	7,89 ± 0,37
		Velho	8,20 ± 0,13	8,19 ± 0,14	8,19 ± 0,07
	<b>0,05MP+0,125D</b>	Novo	8,25 ± 0,02	8,28 ± 0,16	7,96 ± 0,44
		Velho	8,53 ± 0,19	8,18 ± 0,14	8,15 ± 0,04
	<b>0,05MP+0,25D</b>	Novo	8,29 ± 0,06	8,27 ± 0,26	8,07 ± 0,25
		Velho	8,37 ± 0,15	8,14 ± 0,06	8,13 ± 0,15
	<b>0,1MP+0,125D</b>	Novo	8,25 ± 0,03	7,96 ± 0,42	7,85 ± 0,42
		Velho	8,35 ± 0,25	8,22 ± 0,04	8,19 ± 0,06
	<b>0,1MP+0,25D</b>	Novo	8,23 ± 0,02	7,98 ± 0,45	7,99 ± 0,31
		Velho	8,54 ± 0,24	8,24 ± 0,13	8,21 ± 0,09
<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Controlo</b>	Novo	21,4 ± 0,5	21,3 ± 0,6	21,2 ± 0,5
		Velho	21,1 ± 0,3	21,0 ± 0,8	21,6 ± 0,2
	<b>0,05MP</b>	Novo	21,3 ± 0,5	21,4 ± 0,5	21,5 ± 0,6
		Velho	20,8 ± 0,5	20,4 ± 0,7	21,6 ± 0,2
	<b>0,1MP</b>	Novo	21,3 ± 0,6	21,3 ± 0,4	21,4 ± 0,4
		Velho	20,7 ± 0,7	20,4 ± 0,6	21,7 ± 0,3
	<b>0,125D</b>	Novo	20,9 ± 0,6	21,0 ± 0,5	21,3 ± 0,6
		Velho	20,6 ± 0,8	20,3 ± 0,5	21,6 ± 0,3
	<b>0,25D</b>	Novo	21,4 ± 0,7	21,1 ± 0,5	21,4 ± 0,6
		Velho	20,1 ± 0,2	20,3 ± 0,3	21,3 ± 0,6
	<b>0,05MP+0,125D</b>	Novo	21,4 ± 0,3	21,1 ± 0,5	21,4 ± 0,6
		Velho	20,6 ± 0,8	20,4 ± 0,4	21,6 ± 0,4
	<b>0,05MP+0,25D</b>	Novo	21,4 ± 0,3	21,2 ± 0,5	21,2 ± 0,5
		Velho	20,1 ± 0,5	20,3 ± 0,3	21,5 ± 0,5

<b>0,1MP+0,125D</b>		Novo	21,3 ± 0,5	21,1 ± 0,5	21,0 ± 0,6
		Velho	20,4 ± 0,9	20,4 ± 0,3	21,3 ± 0,6
<b>0,1MP+0,25D</b>		Novo	21,3 ± 0,6	21,3 ± 0,5	21,0 ± 0,5
		Velho	20,5 ± 0,7	20,4 ± 0,2	21,4 ± 0,6
<b>Oxigénio dissolvido (mg/l)</b>	<b>Controlo</b>	Novo	8,19± 0,09	8,14 ± 0,33	8,21 ± 0,11
		Velho	8,11 ± 0,37	8,33 ± 0,81	7,42 ± 0,38
	<b>0,05MP</b>	Novo	8,22 ± 0,05	8,10 ± 0,30	8,22 ± 0,05
		Velho	8,71 ± 0,22	8,07 ± 0,83	7,49 ± 0,36
	<b>0,1MP</b>	Novo	8,29 ± 0,07	8,01 ± 0,33	8,26± 0,10
		Velho	8,26 ± 0,81	7,60 ± 0,62	7,47 ± 0,43
	<b>0,125D</b>	Novo	8,20 ± 0,09	8,12 ± 0,37	8,19 ± 0,09
		Velho	8,36 ± 0,01	7,58 ± 0,05	7,40 ± 0,04
	<b>0,25D</b>	Novo	8,24 ± 0,05	8,24 ± 0,13	8,08 ± 0,40
		Velho	8,21 ± 0,80	7,61 ± 0,44	7,73 ± 0,50
	<b>0,05 MP+0,125D</b>	Novo	8,19 ± 0,09	8,17 ± 0,10	8,19± 0,11
		Velho	8,09 ± 1,15	7,68 ± 0,50	7,50 ± 0,46
	<b>0,05MP+0,25D</b>	Novo	8,22 ± 0,11	8,16 ± 0,20	8,23 ± 0,04
		Velho	7,94 ± 0,79	7,51 ± 0,44	7,44 ± 0,50
	<b>0,1MP+0,125D</b>	Novo	8,19 ± 0,08	8,25 ± 0,03	8,29 ± 0,08
		Velho	8,38 ± 0,82	7,71 ± 0,58	7,60 ± 0,43
	<b>0,1MP+0,25D</b>	Novo	8,25 ± 0,04	8,36 ± 0,29	8,21 ± 0,12
		Velho	8,84 ± 0,42	7,66 ± 0,47	7,71 ± 0,35

## Anexo I – Composição química do meio de cultura de *C. vulgaris*

**Tabela I.1.** Composição química do meio MBL usado nas culturas de *Chorella vulgaris* (adaptado de Guilhermino, 1996).

Composto químico	Concentração da solução de reserva (g/l)	Quantidade por meio (ml/l)
------------------	---	-------------------------------

CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	36,76	1
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	36,97	1
NaHCO <sub>3</sub>	12,6	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,71	1
NaNO <sub>3</sub>	85,01	1
NaSiO <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O	28,42	1
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	4,36	1
FeCl <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O	3,15	1
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,01	1
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,02	1
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,01	1
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,18	1
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01	1
Tris(hidroximetil)aminometano (pH 7,2)	250	2

## **Anexo II – Preparação e composição química do meio ASTM usado nas culturas parentais de *D. magna***

O meio ASTM foi preparado a partir de soluções em água u.p. dos compostos NaHCO<sub>3</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, KCl e CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (Tabela B.1). As três primeiras soluções foram preparadas com antecedência e conservadas a 4 °C ao passo que a solução de CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O foi preparada na altura da sua utilização. Para cada vinte litros de meio

ASTM foram utilizados 200 ml das três primeiras soluções e 2 l da solução de  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , sendo o volume completado com água u.p. (Tabela B.1)

**Tabela II.1.** Composição química do meio ASTM utilizado nas culturas parentais de *Daphnia magna* (adaptado de Guilhermino, 1996).

Composto químico	Concentração da solução de reserva (g/l)
$\text{NaHCO}_3$	19,2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	24,6
KCl	0,8
$\text{CaSO}_4$	1,2

### **Anexo III – Preparação da solução de vitaminas usada nos meios de cultura e do extrato de *A. nodosum* usado para enriquecer o meio ASTM**

A solução de vitaminas usada para enriquecer o meio de cultura de *C. vulgaris* e de *D. magna* continha tiamina, biotina e de cianocobalamina nas concentrações de 1,0 mg/l,  $5,0 \times 10^{-4}$  mg/l e de  $5,0 \times 10^{-4}$  mg/l, respetivamente. Esta solução foi preparada a partir de soluções separadas (uma para cada vitamina) mais concentradas das respetivas vitaminas. Estas soluções individuais foram preparadas em água u.p. e correspondiam a

20 mg/l para a tiamina e 10 mg/l para a biotina e cianocobalamina. Para cada um litro de solução de complexo vitamínico foram utilizados 5 ml da solução de tiamina e 0,05 ml de cada uma das soluções de biotina e cianocobalamina. Após a sua preparação, esta solução foi filtrada, em condições assépticas, através de filtros de seringa de 0,22 µm (Millex-GS®, Merck Millipore, Alemanha) para microtubos plásticos de 2 ml, sendo estes reservados a -20 °C até à data da sua utilização. Todo o material utilizado na filtração da solução do complexo vitamínico foi previamente esterilizado em autoclave durante 60 min a  $120 \pm 1$  °C (Uniclave 77 ou 88, AJC, Portugal).

O extrato de *A. nodosum* usado para enriquecer o meio de cultura de *D. magna* foi preparado pela adição de cerca de 12 ml de uma solução concentrada de *A. nodosum* a um volume de 1 l, sendo o volume completado com água u.p. Após homogeneização, a absorvância desta solução foi lida a 400 nm (SpectraMax M2®, Molecular Devices, EUA), numa proporção de 1/10, até ser obtida uma solução final com valor de densidade ótica igual a 0,620. Este suplemento foi mantido a 4 °C e protegido da luz.